Molekularbiologische Charakterisierung der Plasmidausstattung von Agrobacterium tumefaciens Stämmen, die durch Genomumstrukturierung entstanden sind

vorgelegt von
Irmtraud Bauer
aus Breitenbrunn

Diss
Erlangen

1986 N 310

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538126_0023

Molekularbiologische Charakterisierung der Plasmidausstattung von Agrobacterium tumefaciens Stämmen, die durch Genomumstrukturierung entstanden sind

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Irmtraud Bauer
aus Breitenbrunn

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen
Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung	: 28.04.1986
Vorsitzender der Promotionskommission	: Professor Dr. K. Brodersen
Erstberichterstatter	: Professor Dr. W. Heumann
Zweitberichterstatter	: Professor Dr. E. Schweizer

Für meine Familie

In Liebe

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A.	Zusammenfassung	1
B.	Einleitung	3
C.	Material und Methoden	7
C.1.	Material	7
C.1.1	Bakterienstämme	7
C.1.2	Nährmedien	8
C.1.3	Puffer und Lösungen	9
C.1.4	Enzyme	9
C.1.5	Chemikalien	10
C.1.6	Geräte	11
C.1.7	Sonstiges	11
C.2.	Methoden	12
C.2.1	Bakterienanzucht	12
C.2.2	Lysemethoden	12
C.2.2.1	Sarkosyllyse	12
C.2.2.2	Sarkosyl-Phenollyse	12
C.2.2.3	Birnboim-Doly-Lyse	13
C.2.2.4	Eckhardt-Simon-Lyse	13
C.2.3	CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation	13
C.2.4	Aufarbeiten der DNA aus dem CsCl-EtBr-Dichtegradienten	13
C.2.5	DNA-Konzentrierung	14
C.2.5.1	Konzentrieren der DNA durch EtOH-Fällung	14
C.2.5.2	Einengen der DNA mit Sephadex G 200	14
C.2.6	Verdauung der DNA mit Restriktionsenzymen	14
C.2.7	Agarosegelelektrophorese	15
C.2.8	DNA-Fragmentisolierung	15
C.2.8.1	Fragmentisolierung aus dem "Low Gelling" Agarosegel	15
C.2.8.2	Fragmentisolierung nach der "Freeze Squeeze" Methode	16
C.2.9	Densitometrische Auswertung der Agrosegele	16

C.2.10	DNA-Längenmessung im Elektronenmikroskop	16
C.2.11	DNA-Dichtebestimmung durch CsCl-Dichtegradienten-zentrifugation in der analytischen Ultrazentrifuge	17
C.2.12	Klonierung von pAT 18-31	17
C.2.13	DNA/DNA-Hybridisierung	18
C.2.13.1	Southern Transfer	18
C.2.13.2	Nick-Translation	19
C.2.13.3	Hybridisierungsbedingungen	20
C.2.13.4	Waschbedingungen für NC-Filter	20
C.2.13.5	Autoradiographie	21
C.2.14	Octopin und Nopalin Nachweis	21
C.2.14.1	ODH und NDH Nachweis	21
C.2.14.2	Papierelektrophoretische Auftrennung von Octopin und Nopalin	22
D.	Ergebnisse	24
D.1.	Die 3 Gruppen der Klasse I Stämme	24
D.1.1	Vergleich der Restriktionsmuster der Gesamt-DNA von Agrobacterium Stämmen des Schemas mit Agrobacterium Stämmen aus der PC	24
D.1.2	Gesamt-DNA Restriktionsmuster der Min-Typ Stämme	27
D.1.3	Plasmid-Vergleich der Agrobacterium Stämme	28
D.1.4	Plasmid-Vergleich der Min-Typ Stämme	32
D.1.5	Restriktionsmuster der kleinen Plasmide von Agrobacterium und Min-Typ Stämmen	34
D.2.	DNA-Dichten der kleinen Plasmide	36
D.3.	Elektronenmikroskopische Längenbestimmung von pMT 31-15, pMT 18-31 und pAT 18-31	38
D.4.	Restriktionsmuster der kleinen Plasmide von 18-31 und 31-15 im Vergleich	40
D.5.	Homologie von pMT 31-15 und pMT 18-31	43
D.6.	Hybridisierungsversuche mit T-DNA aus pTiACH5	45

D.6.1	Hybridisierung von Gesamt-DNA der Schema-Stämme mit pGV 0201 und pGV 0153	47
D.6.2	Homologie-Untersuchungen zwischen Plasmid-DNA der Klasse I des Schemas mit T-DNA: pGV 0153, pGV 0201 und pGV 0201/HindIII-1	50
D.6.3	pAT 18-31/BamHI-Klonierung	54
D.6.4	Hybridisierung von pGV 0201 mit klonierter pAT 18-31 DNA	58
D.6.5	Feinlokalisierung des Homologiebereichs zwischen pGV 0201/HindIII-1 und dem BamHI-2 Fragment aus pIB 1	61
D.7.	Octopin und Nopalin Nachweis	64
D.7.1	Auflösungsgrenzen für Octopin und Nopalin	64
D.7.2	Tumorbildung auf Kartoffelscheiben und Bryophyllum	66
D.7.3	Octopin und Nopalin in Tumor-Rohextrakten	70
D.7.4	ODH- und NDH-Aktivität in Tumor-Rohextrakten	72
E.	Diskussion	75
E.1.	Die Agrobacterium und Min-Typ Stämme des Schemas	75
E.2	Vergleich der Agrobacterium Stämme des Schemas mit Agrobacterium Stämmen aus der Phabagen Collection	79
E.3	Hybridisierungsversuche mit T-DNA aus pTiACH 5; Lokalisierung des Homologiebereichs von pGV 0201 und pAT 18-31	81
Anhang I:	Zusammenstellung der verwendeten Abkürzungen	87
Anhang II:	Literaturverzeichnis	89

A. Zusammenfassung

Die Klasse I des Genomumstrukturierungs-Schemas der Rhizobiaceae (Heumann et al., 1984) umfaßt die Stämme Agrobacterium (Ib) und Minimal-Typ (Min-Typ, Ia).

Diese Agrobacterien bilden eine sehr homogene Gruppe mit identischem Restriktionsmuster der Gesamt-DNA und einheitlicher Plasmidausstattung. Neben drei großen Plasmiden mit 126, 140 und 300 Md (Heumann et al., 1984) treten bei allen untersuchten Agrobacterium Stämmen des Schemas zusätzlich zwei kleine Plasmide (pAT + pMT) von 23 Md (pAT) und 24 Md (pMT) auf.

Die Min-Typ Stämme kann man in zwei Gruppen Iaα und Iaß einteilen, die sich durch Herkunft, Restriktionsmuster der Gesamt-DNA und Plasmide unterscheiden.
Bei der Min-Typ Gruppe Iaα tritt wie in den Agrobacterium Stämmen ein kleines Plasmid mit 24 Md (pMT) neben einem großen Plasmid von ca. 300 Md auf. Das Restriktionsmuster der Gesamt-DNA zeigt große Ähnlichkeit mit dem der Agrobacterien.
Die Min-Typ Gruppe Iaα umfaßt mit großer Wahrscheinlichkeit Agrobacterium Stämme, die drei Plasmide mit 23 Md (pAT), 126 Md und 140 Md verloren haben.

In Min-Typ Stämmen Iaß sind zwei große Plasmide (größer 100 Md) nachzuweisen.
Plasmidmuster und Restriktionsmuster der Gesamt-DNA der Min-Typ Gruppe Iaß unterscheidet sich von denen der Agrobacterien.

Die kleinen Plasmide der Agrobacterium Stämme (pAT + pMT) und der Min-Typ Stämme Iaα (pMT) wurden genauer untersucht und charakterisiert.
Hybridisierungsversuche zwischen pMT der Agrobacterien und pMT der Min -Typ Stämme ergaben völlige Homologie.

Homologie konnte auch festgestellt werden zwischen der T-DNA von pTiACH5 und der Doppelbande der großen Plasmide (126 Md, 140 Md) der Agrobacterium Stämme des Schemas; zumindest eines dieser Plasmide ist demnach ein Ti-Plasmid.
Außerdem ergab sich eine Homologie zwischen dem T-DNA Fragment EcoRI-19a von pTiACH5 (rechte Seite der T_L-DNA) und dem Fragment BamHI-2 von pAT 18-31.
Homologie mit T-DNA ist demnach sowohl auf einem großen als auch auf einem kleinen Plasmid der Agrobacterium Stämme des Schemas vorhanden.

In Kartoffel- oder Bryophyllumtumoren, induziert durch Agrobacterium Stamm 18-31 konnte weder Octopin noch Nopalin nachgewiesen werden.
Die A. tumefaciens Kontrollstämme PC 2500 (B_6S_3) und C58 induzierten auf Kartoffelscheiben und Bryophyllum Octopin- bzw. Nopalin-haltige Tumoren.

B. Einleitung

Die genetische Wechselwirkung zwischen einem prokaryontischen und einem eukaryontischen System ist ein Charakteristikum der Rhizobiaceen:
Rhizobium lebt in Symbiose mit Leguminosen unter Ammoniak- und Kohlenhydrataustausch (zur Übersicht siehe Roberts and Brill 1981).
Agrobacterium dagegen infiziert verwundete Pflanzen und veranlaßt diese zu einer unkontrollierten Tumorbildung. Die Pflanze wird durch ins Pflanzengenom integrierte bakterielle T-DNA zur Bildung von Opinen benutzt, welche nur einseitig von Agrobacterium verwertet werden können (zur Übersicht siehe Schell et al. 1979).

Das Rhizobium und Agrobacterium Genom wurde oft vergleichend untersucht. Homologie wurde zwischen Agrobacterium Ti-Plasmiden und Rhizobium nif-Plasmiden (Prakash and Schilperoort 1982) sowie zwischen Agrobacterium T-DNA und extrachromosomaler und chromosomaler Rhizobium DNA (Hadley and Szalay 1982) nachgewiesen.

W. Heumann untersuchte das Verhalten von Rhizobium und Agrobacterium unter Einwirkung DNA-schädigender Agentien mit nachfolgender Stressbehandlung.
Als Ergebnis dieser Forschung stellte Heumann (1983 und 1984) das Genomumstrukturierungsschema der Rhizobiaceae (Abb. 1) vor, dem eine weitreichende Verwandtschaft und Zusammengehörigkeit nodulierender Rhizobien, pflanzenonkogener Agrobacterien, freilebender Stickstoffixierer und pigmentierter -teilweise nodulierender- Bakterienstämme zugrunde liegt.

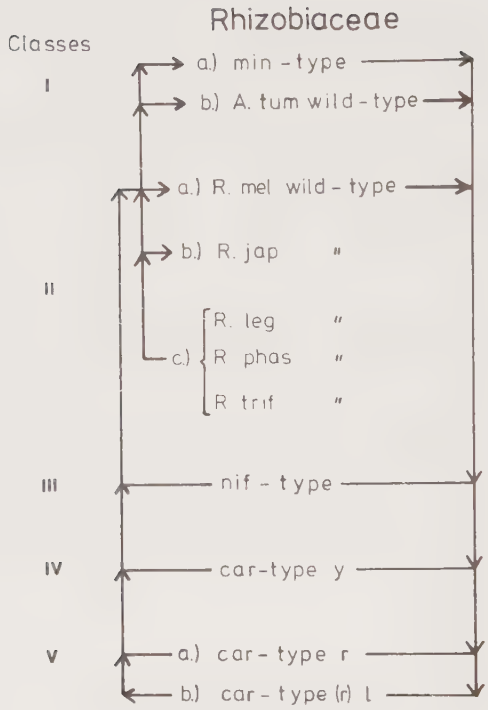


Abb. 1
Die 5 Klassen des Genomumstrukturierungsschemas der Rhizobiaceae (Heumann et al. 1984).
Die Pfeile weisen auf Umkehrbarkeit der Umstrukturierung hin.
Die Beschreibung der einzelnen Klassen: siehe Text.

Das Genomumstrukturierungsschema der Rhizobiaceen -im Folgenden kurz "Schema" genannt- setzt sich aus 5 Bakterienklassen zusammen, die größtenteils reversibel ineinander durch UV-Bestrahlung mit nachfolgender Stressbehandlung überführbar sind. An der Induktion der "Umwandlung" könnte ein UV-induzierbares DNA-repair-System vergleichbar dem SOS-repair bei E.coli (Little and Mount 1982) beteiligt sein (Heumann et al. 1984).

In der Klasse I des Schemas wurden onkogene Agrobacterium und nicht onkogene Min-Typ Stämme zusammengefaßt. Agrobacterium und Min-Typ Stämme haben ein identisches Restriktions-Modifikationssystem (Winkler 1984), sie können nach Koloniefom, Generationszeit und in der Plasmidausstattung unterschieden werden.

Die Klasse II besteht aus Rhizobium Wildtyp Stämmen, die Leguminosenpflanzen spezifisch und effektiv nodulieren. Die Plasmidausstattung dieser Stämme ist heterogen. In R. meliloti wurdenvon Burkardt und Burkardt (1984) Plasmide mit mehr als 1000 Md nachgewiesen. Die Generationszeiten und die DNA-Dichten variieren in den Stämmen der Klasse II.

In die Klasse III des Schemas wurden freilebende, unter aeroben Bedingungen N_2-fixierende Bakterien eingeordnet, die sich in ihren biophysikalischen und genetischen Eigenschaften sehr ähnlich sind.

Die Stämme der Klasse IV bilden gelbe, ß-Carotinoid-haltige Pigmente (Kleinig 1977). Heumann (1971 und 1973) konnte durch Konjugationsversuche die hohe Fertilität der Klasse IV Stämme auf ein bidirektionell funktionierendes Konjugationssystem zurückführen und eine Chromosomenkarte der car-Typ y Stämme aufstellen (Heumann 1979).

In der Klasse IV konnte bisher keine extrachromosomale DNA gefunden werden.
Das von Priefer (1980) isolierte Insertionselement ISR 1, das spezifisch für die Klasse IV ist, konnte von Rüger (1984) in verschieden hoher Kopienzahl an teilweise unterschiedlichen Stellen des Chromosoms der Klasse IV Stämme nachgewiesen werden.

Die Stämme der Klasse V bilden eine Gruppe mit vielseitigen Eigenschaften.
Zur Klasse V gehören durch C_{30}-Carotinoide (Kleinig et al. 1979) rot pigmentierte, äußerst bewegliche Bakterien, die zunächst fälschlich als Pseudomonas rhodos eingeordnet wurden (Heumann 1962).
Daneben konnte ein von Norris (1958) aus effektiven Wurzelknöllchen von Lotononis bainesii isolierter, rot pigmentierter Stamm, sowie fakultativ methylotrophe Bakterien, isoliert aus Bodenproben (Stolp, Bayreuth, persönliche Mitteilung 1983) ebenfalls nach ihren biophysikalischen Daten in die Klasse V eingeordnet werden.
Die Plasmidausstattung und das Gesamt-DNA Restriktionsmuster der Stämme der Klasse V ist variabel (R. Springer, Instituts-internes Symposium 1982; Petra Franke 1984).

Ziel dieser Arbeit war es, die kleinen Plasmide von Agrobacterium und Min-Typ Stämmen der Klasse I biophysikalisch zu untersuchen.
Die Agrobacterium Stämme der Klasse I waren mit A. tumefaciens Standard-Stämmen aus der PC hinsichtlich Restriktionsmuster der Gesamt-DNA und Plasmidausstattung zu vergleichen und auf Octopin und Nopalin Produktion in den durch diese Bakterien hervorgerufenen Tumoren zu untersuchen.
Außerdem sollte untersucht werden, ob die Stämme des Schemas Homologie mit core T-DNA von Octopin und Nopalin Ti-Plasmiden zeigen und wo die homologen Gene lokalisiert sind.

C. Material und Methoden

C. 1. Material

C. 1.1 Bakterienstämme

A. tumefaciens	Genotyp	Herkünft
PC 2500	A.tum.B_6-pTiB_6S_3	Phabagen Collection (PC), Utrecht, NL
PC 2501	A.tum.B_6S_3-pTiB_6S_3	"
PC 2590	A.tum.ACH5-pTiACH5	"
GV 4100	A.tum.pTiB_6S_3::RP4	Schell, Köln-Vogelsang
18-1	-	Kocur, Prag, CSSR
C 58	A.tum.C58	B. Broughten, Köln-Vogelsang

E.coli K 12	Genotyp	Herkunft
HB 101	aux. recA, Sm	Stammsammlung Erl.
HB 101(pBR322)	aux. recA, Sm, Ap, Tc	"
C 600(pGV0153)	pTiACH5/BamHI-8	Schell, Köln-Vogelsang
C 600(pGV0201)	pTiACH5/HindIII-1	"

Min-Typ	entstanden aus	Herkunft
31-1	R.meliloti 20-49	W. Heumann
31-15	nif-Typ 30-36	"
31-22	Agrobacterium 18-30	"
31-24	R.japonicum 8-40	"
31-25	Agrobacterium 18-30	"
31-35	Rhizobium japonicum 32-10	"

Agrobacterium	entstanden aus	Herkunft
18-23	R.meliloti 20-1	W. Heumann
18-24	R.meliloti 20-49	"
18-25	R.lupini 8-52	"
18-26	R.leguminosarum 8-51	"
18-27	R.japonicum 8-41	"
18-28	R.japonicum 8-40	"
18-29	R.phaseoli 8-35	"
18-30	R.trifolii 8-34	"
18-31	nif-Typ 30-36	"

C. 1.2 Nährmedien

Flüssigmedien:

Für Rhizobium und Agrobacterium:

LL :	Lab Lemco Broth (Oxoid)	8	g/l
YMB :	Yeast Mannitol Broth		
	Hefe-Extrakt	0,4	g/l
	NaCl	0,5	g/l
	Mannit (getrennt autoklav.)	10	g/l
	$MgSO_4$ "	0,2	g/l

Für E.coli:

PA :	Antibiotic Medium III (Oxoid)	17,5	g/l

Festmedien:

Für Agarplatten wurde den genannten Flüssigmedien 15 g Agar (Oxoid) pro Liter zugesetzt.

Antibiotika-Zusätze für E.coli:

Ampicillin (Hoechst), Ap 50 mg/ml
Tetracyclin = Reverin (Hoechst), Tc 10 mg/ml
Chloramphenicol 15 µg/100 ml gelöst in Ethanol

C. 1.3 Puffer und Lösungen

TA: 40 mM Tris/HCl, 10 mM NaAc, 5 mM EDTA, pH 7,8
TB: 90 mM Tris/HCl, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA, pH 8,2
TE: 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8
TES: 50 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8
TCM: 10 mM Tris/HCl, 10 mM $CaCl_2$, 10 mM $MgCl_2$, pH 7,5
SSC: 150 mM NaCl, 15 mM NaCitrat

Reaktionspuffer für Verdauungen:

Enzym	Tris/HCl	NaCl	$MgCl_2$	Sonstiges	pH
EcoRI	10 mM	100 mM	10 mM	-	7,5
BamHI	10 mM	10 mM	5 mM	1 mM 2-MercaptoEtOH	7,4
Pst I	10 mM	50 mM	10 mM	-	7,5
Sma I	15 mM	-	6 mM	15 mM KCl	8,5
HindIII*	6 mM	50 mM	6 mM	5 µg/ml BSA	7,5
HindIII**	10 mM	50 mM	10 mM	-	7,5

C. 1.4 Enzyme

Restriktionsenzyme:

EcoRI: Dr. Rösch, Erlangen
PstI : Dr. Rösch, Erlangen und Boehringer, Mannheim
BamHI, HindIII und SmaI : Boehringer, Mannheim

Sonstige Enzyme:

DNAP I : Boehringer, Mannheim
DNase I : Serva, Heidelberg
RNase : Serva, Heidelberg
Lysozym : Serva, Heidelberg oder Boehringer, Mannheim
BAP = Bakterielle Alkalische Phosphatase : BRL
T_4-Ligase : Dr. Rösch, Erlangen

C. 1.5 Chemikalien

Agarose	Sigma, München
Low Gelling Agarose	"
Polyvinylpyrrolidon	"
D-(+)-Octopin	"
Nopalin	"
Sepharose	"
Phenanthrenchinon	"
Methylgrün	"
Tris/HCl	"
Bromphenolblau, BPB	Serva, Heidelberg
Cytochrom c	"
Kalbsthymus-DNA	"
Sarkosyl NL-97	"
SDS	"
Typ MB 1 Amberlite	"
Na-Pyruvat	"
Siliconlösung	"
Sephadex G-200	Pharmacia, Uppsala
Ficoll	"
Formamid	Fluka
^{32}P-dATP	NEN oder Amershan
Roentogen	Tetenal, Hamburg

NADH	Boehringer
Dithiothreithol (DTT)	"
CsCl	Jansen
Ascorbinsäure, Cystein-HCl	Nutritional Biochemicals Corporation Cleveland, Ohio

Alle nicht einzeln aufgelisteten Chemikalien wurden von der Firma Merck bezogen.

C. 1.6 Geräte

Sorvall-RC-5B-Kühlzentrifuge, Rotor SS 34 und GSA (Du Pont, Bad Nauheim

Präparative Ultrazentrifuge TGA 65 (Kontron, Eching), Rotoren 50 Ti und 60 Ti (Beckman)

Analytische Ultrazentrifuge, AN-F-Ti-Rotor (Beckman)
Spektralphotometer (Zeiss, Oberkochen), Modell 25
Densitometer 337 (Boskamp)
Elektronenmikroskop (Philips 400)
Polaroid-Kamera MP4. Filme 665 (Polaroid, Offenbach)
Transilluminator C61 (Vetter, Wiesloch), 254 nm
Vertikalelektrophorese, Apparatur nach Dr. Blohm (GBF Braunschweig-Stöckheim)
Horizontalelektrophorese, Apparatur nach Dr. Rösch, Erlangen
Minigelkammer, Apparatur nach Volckaert, Ghent
Tischzentrifuge (Eppendorf)
Scintillationszähler (Betamatic B)

C. 1.7 Sonstiges

Whatman 3 MM Chromatographiepapier (Whatman, Ltd., England)
Nitrocelluosefilter (NC), (Schleicher & Schüll)
Visking Dialysierschlauch (Serva, Heidelberg)
Röntgenfilme, Kodak X-Omat AR (Lacher, Erlangen)

C. 2. Methoden

C. 2.1 Bakterienanzucht

Die Rhizobium und Agrobacterium Stämme wurden bei 30°C, E. coli Stämme bei 37°C inkubiert.

C. 2.2 Lysemethoden

C. 2.2.1 Sarkosyllyse

Zur Isolierung von Gesamt-DNA und Plasmid-DNA (kleine Plasmide) wurde die Methode nach Bazaral und Helinski (1968) angewandt. Bei diesem Verfahren werden die Zellen durch Lysozym und Sarkosyl aufgeschlossen, RNA wird durch RNase-Behandlung zerstört. Durch Scheren wird chromosomale DNA in zur Isolierung adäquate Stücke zerlegt.

Dieser Lysemethode folgte stets eine Reinigung der zu isolierenden DNA über einen CsCl-EtBr-Dichtegradienten (vgl. C.2.3.).

C. 2.2.2 Sarkosyl-Phenollyse

Zur schnellen Isolierung von Gesamt-DNA ohne CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation werden die Bakterienzellen auf einer Vollmediumplatte angezogen, mit 5 ml TES-Puffer gewaschen und mit 1 ml 10%iger Sarkosyllösung in TES aufgeschlossen. Nach Verdünnen des Lysats mit 3 ml TES werden durch Zugabe von 4 ml Phenol und 30 Minuten Inkubation bei 37°C (unter Schütteln) vorhandene Proteine denaturiert. Nach Trennen der Phasen durch Zentrifugation bei Raumtemperatur wird die wässrige (obere) Phase abgezogen und ausgiebig gegen TE-Puffer dialysiert. Die DNA-Lösung kann direkt zu Verdauungen verwendet werden.

C. 2.2.3 Birnboim-Doly-Lyse

Die Birnboim-Doly Methode zur Isolierung von Multicopy-Plasmiden wurde zur Isolierung von pIB 1-6 verwendet.
Die Methode ist ausführlich von Birnboim und Doly 1979 beschrieben.

C. 2.2.4 Eckhardt-Simon-Lyse

Diese Methode zur Darstellung von Plasmiden im TB-Agarosegel wurde von Eckhardt et al. (1978) entwickelt und von Simon (Bielefeld) modifiziert.
Die modifizierte Methode ist ausführlich in der Dissertationsarbeit von Rüger (1984) beschrieben.

Änderung: statt 0,9% --- 0,7% TB-Agarosegel
statt 100 V --- 110 V Elektrophoresespannung

C. 2.3 CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation und

C. 2.4 Aufarbeiten der DNA aus dem CsCl-EtBr-Dichtegradienten

Die Reinigung der DNA über CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation wurde nach Radloff et al. (1967) durchgeführt. Diese DNA-Reinigungsmethode, sowie das Aufarbeiten der DNA aus dem CsCl-EtBr-Dichtegradienten ist ausführlich bereits in meiner Diplomarbeit, Bauer (1981), beschrieben.

C. 2.5 DNA-Konzentrierung

C. 2.5.1 Konzentrieren der DNA durch EtOH-Fällung

Zur Einengung von kleinen DNA-Mengen wurde die wässrige DNA-Lösung mit 1/10 Vol. 3 M NaAcetat versetzt und mit 3 Vol, 96%igen EtOH bei -20°C (über Nacht) oder -70°C (30 Minuten) gefällt, mit 70%igen EtOH gewaschen und in geringem Volumen H_2O (bidest.) oder TE-Puffer resuspendiert.

C. 2.5.2 Einengen der DNA mit Sephadex G 200

Große DNA-Mengen wurden zur Konzentrierung in sterile Dialyse-Schläuche gefüllt und mit Sephadex G 200 bestreut bis die gewünschte Menge Wasser aus der DNA-Lösung entzogen war. Nach 2-5 Minuten Dialyse gegen TE-Puffer konnte die konzentrierte DNA-Lösung abgezogen werden.

C. 2.6 Verdauung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die zur Verdauung verwendete DNA wurde nach Isolierung einer Konzentrationsbestimmung durch Agarosegelelektrophorese und einer spektralphotometrischen Konzentrationsbestimmung unterzogen. 1 - 2 µg DNA Reaktionsansatz wurden mit dem jeweiligen Restriktionsenzym nach Vorschrift des Enzym-Herstellers verdaut.

Anmerkung: Bei HindIII-Verdauung mit HindIII**-Puffer wurden zusätzlich 1 - 2 µl inaktiviertes EcoRI pro 50 µl Spaltansatz zugegeben.
Bei allen Doppelverdauungen wurde HindIII**-Puffer verwendet.
(HindIII**-Puffer: vgl. C.1.3)

C. 2.7 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von Plasmid-DNA oder DNA-Fragmenten wurde im 0,8%igen TA-Agarosegel in einer vertikalen oder horizontalen Elektrophoresekammer durchgeführt, wie bereits früher beschrieben (Bauer 1981).

C. 2.8 DNA-Fragmentisolierung

C. 2.8.1 Fragmentisolierung aus dem "Low Gelling" Agarosegel

Die DNA-Lösung mit dem zu isolierende Fragment wird auf ein 1%iges TA-Agarosegel (mit low gelling Agarose) in der Minigelkammer oder in der horizontalen Elektrophoresekammer aufgetragen und elektrophoretisch ausgetrennt.
Nach Anfärben des Gels mit EtBr wird die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht, das gewünschte Fragment ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß gesteckt. Nach Zugabe von 1 Vol/Vol 0,1 M TA pH 7,5; 5 mM EDTA und 0,5 M NaCl wird die Agarose mit einem silikonisierten Glasstab zerkleinert, im 65°C Wasserbad unter leichtem Bewegen erhitzt bis die Agarose geschmolzen ist. Dann wird 1 Vol/Vol TE-gesättigtes Phenol (65°C) zugegeben und 20 Minuten leicht bewegt.
Nach Abzentrifugieren in der Eppendorf-Tischzentrifuge wird die obere DNA-Phase abgezogen. Das DNA-Fragment wird nochmals phenolisiert, zweimal mit Ether extrahiert und mit EtOH gefällt (vgl. C.2.5.1).

Für Hybridisierungsversuche wurde das Fragment durch Agarosegelelektrophorese mit normaler Agarose vorgereinigt, die gewünschte Bande ausgeschnitten und im low-gelling Agarosegel elektrophoretisch weiter aufgetrennt und daraus isoliert wie oben beschrieben.

C. 2.8.2 Fragment-Isolierung nach der "Freeze-Squeeze" Methode

Das zu isolierende DNA-Fragment wurde nach Auftrennung durch Agarosegelelektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten und nach der Gefriermethode von Trautz und Renz (1983) isoliert.

C. 2.9 Densitometrische Auswertung der Agarosegele

Zum Vergleich der Wanderungsstrecken von DNA-Fragmenten und zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurden die Abstände der Fragmente vom Startpunkt der Elektrophorese mit Hilfe eines Densitometers vermessen und damit vergrößert aufgezeichnet. Dazu wurden die Gelbahnen der Negative (der von den Gelen angefertigten Polaroid-Bilder) abgetastet und die Adsorption im sichtbaren Bereich über die gesamte Gelbahn bestimmt. Als Referenz diente λ/EcoRI, λ/EcoRI+HindIII und λ/HindIII (Szybalski und Szybalski 1979), Fragmente bekannter Größe.

C. 2.10 DNA-Längenmessung im Elektronenmikroskop

Die in dieser Arbeit vermessenen Plasmide wurden nach der Droplet- oder der Formamidspreitungs-Methode (Burkardt und Lurz 1984) für das Elektronenmikroskop präpariert.
Diese DNA-Präparierungsmethoden basieren auf der von Kleinschmidt und Zahn (1959) entwickelten Protein-Monolayer Technik, welche einen einschichtigen Cytochrom-C-Film zur Adsorption, Auffaltung und Stabilisierung der DNA vorschreibt.

Zur Längenmessung wurden Plasmid-Moleküle (oc-Form) mit einer ins Elektronenmikroskop integrierten Kamera bei einer bestimmten Vergrößerung fotographiert, die Aufnahmen über einen Projektor vergrößert und die Länge der Moleküle mit einem externen Gitterstandard -bei derselben Vergrößerung fotographiert- mit einem Meßgerät ermittelt.

C. 2.11 DNA-Dichtebestimmung durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation in der analytischen Ultrazentrifuge

Die Dichte von chromosomaler DNA und von Plasmid-DNA wurde nach Bazaral und Helinski (1968) in der analytischen Ultrazentrifuge wie bereits früher beschrieben (Bauer 1981) ermittelt.

C. 2.12 Klonierung von pAT 18-31

Die BamHI-Fragmente von pAT 18-31 wurden mit Hilfe des Vektors pBR 322 kloniert. Die Klonierungsschritte setzten sich wie folgt zusammen:

1. Vollständige Verdauung von pAT + pMT 18-31 und pBR 322 mit BamHI
2. Phenolisieren, Etherisieren und EtOH-Fällen der DNA der Verdauungsansätze
3. Behandlung des Vektors pBR 322 mit bakterieller, alkalischer Phosphatase (BAP, 1,5 Stunden bei 68°C), Entfernen der BAP durch Phenolisierung
4. Ligierung der pAT + pMT 18-31 BamHI-Fragmente in die BamHI-Schnittstelle von pBR 322 mit Hilfe von T_4-Ligase:

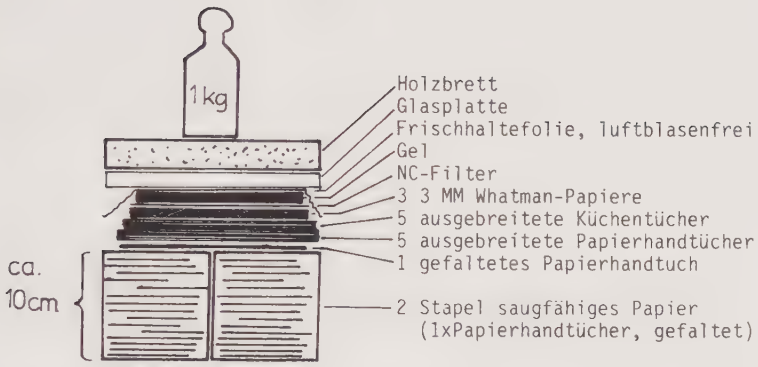
Ligierungsmischung:
25 µl (2,5 µg) pAT + pMT 18-31/BamHI-Fragmente und
25 µl (2,5 µg) pBR 322/BamHI/BAP in 50 mM Tris-HCl (pH 7,8) und 10 mM $MgCl_2$ werden zunächst je 10 Minuten bei 60°C, 37°C, Raumtemperatur und 14°C inkubiert und nach Zugabe von:
10 µl 0,01 M ATP
20 µl 0,2 M DTT
10 µl T_4-Ligase C
10 µl 0,05 M Tris-HCl (pH 7,8)
ca. 20 Stunden bei 14°C ligiert.

5. Transformation von 25 µl Ligierungsmischung + 75 µl TCM-Puffer in kompetente (vgl. Dagert und Ehrlich 1979) E. coli HB 101 Zellen
6. Selektion der Transformanten nach Ampicillin-Resistenz und Tetracyclinsensitivität auf PA + Ap bzw. PA + Tc-Agar-Platten
7. Identifizierung der Hybridplasmide mit pBR 322 / pAT 18-31-BamHI-Fragmenten durch Darstellung der Plasmide im Eckhardt-Simon-Gel (vgl. C.2.2.4) und in der Birnboim-Doly-Lyse (vgl. C.2.2.3)

C. 2.13 DNA/DNA-Hybridisierung

C. 2.13.1 Southern-Transfer

Zur Untersuchung von DNA/DNA-Homologien wurden Plasmide oder DNA-Fragmente nach einer von Southern (1975) entwickelten und von Rüger (1984) genau beschriebenen Methode im Agarosegel aufgetrennt, alkalisch denaturiert und neutralisiert. Die Übertragung der 1-strängigen DNA-Stücke aus dem Gel auf NC-Filter wurde durch saugfähiges Papier im sogenannten "Trocken-Blot-Verfahren" bewirkt. Der Versuchsaufbau ist abgebildet:



Der Transfer erfolgte in 12-36 Stunden. Danach wurden die NC-Filter exakt am Rand des Gels ausgeschnitten und auf 3 MM Whatman-Papier 4 Stunden bei 80°C getrocknet. Nach Einschweissen der NC-Filter in Folien wurden diese bei 4°C aufbewahrt.

C. 2.13.2 Nick-Translation

Bei der radioaktiven Markierung von DNA wurde nach Rigby et al. (1977) vorgegangen:
Mit DNaseI wurden statistisch verteilte Einzelstrangbrüche (=nicks) in der DNA gesetzt. Unter Polymerase I Einwirkung wurde radioaktives ^{32}P-α-ATP in die Bruchstelle eingebaut und die DNA somit markiert. Die Durchführung ist in Rüger (1984) bereits beschrieben. Nach der Markierung wurden nicht eingebaute Triphosphate über eine 1 ml Sepharose-Plastiksäule von der radioaktiv markierten DNA getrennt. Als visueller Marker wurden dem Nick-Ansatz 2 µl Bromphenolblau in 50% Glycerin und 1% XylencyanolH zugesetzt.
10 Fraktionen à 2 Tropfen wurden im Scintillationszähler ausgezählt und die Einbaurate von radioaktiven Phosphat bestimmt.

C. 2.13.3 Hybridisierungsbedingungen

Nach Vorinkubation der NC-Filter (Southern 1975, Rüger 1984) zur Absättigung freier DNA-Bindungsstellen, und nach Ermittlung der optimalen Hybridisierungstemperatur (Southern 1979) nach der Formel $T_{opt} = T_m - 25°C$

(T_m = Schmelztemperatur der DNA

= 81,5 + 16,6·logSSC+0,41(G+C in %))

wurden die NC-Filter mit der Hybridisierungslösung in Folien eingeschweißt und 16 - 48 Stunden bei der gewünschten Temperatur inkubiert.

Hybridisierungslösung:

10 - 50% (mit Amberlite) deionisiertes Formamid, Konzentration je nach gewünschter Stringenz (Southern 1979)
5 x SSC (1 x SSC = 150 mM NaCl, 15 mM NaCitrat)
1 x Denhardt (= 0,02% Ficoll 400, 0,02% BSA, 0,02% Polyvinylpyrrolidon, (Denhardt 1966))
0,1% NaPyrophosphat
50 µg/ml mit NaOH denaturierte (Rüger 1984) Kalbsthymus-DNA
^{32}P-markierte, mit 1/2 Vol. 1 N NaOH denaturierte DNA

Die jeweils verwendete Formamid-Konzentration und die Hybridisierungstemperatur ist bei den einzelnen Abbildungen der Autoradiographien angegeben.

C. 2.13.4 Waschbedingungen für NC-Filter

Um unspezifisch gebundene radioaktive DNA zu entfernen wurden die NC-Filter unter leichtem Schütteln nach der Hybridisierung gewaschen:
Unter stringenten Bedingungen wurde bei 68°C mit 0,1% SDS, 20 mM Phosphat-Puffer und einer absteigenden SSC-Konzentration von 2XSSC bis 0,2XSSC gewaschen.

Unter relaxierenden Bedingungen wurde bei 37°C mit 0,1% SDS, 20 mM Phosphat-Puffer und 6XSSC und 2XSSC gewaschen.

Nach 30 Minuten trocknen bei 80°C wurden die NC-Filter autoradiographiert.

C. 2.13.5 Autoradiographie

Die Autoradiogramme entstanden in lichtfrei schließenden Kassetten mit Verstärkerfolie bei -20°C oder -70°C. Exponiert wurden die Röntgenfilme 1 - 14 Tage, je nach Qualität der radioaktiven Markierung.
Nach Entwickeln der Röntgenfilme (unter Rotlicht) in Röntogen und Superfix konnten homologe DNA-Fragmente durch Vergleich des Autoradiogramms mit 1:1 Vergrößerungen von Gelbildern identifiziert werden.

C. 2.14 Octopin und Nopalin Nachweis

C. 2.14.1 ODH und NDH Nachweis

Der Nachweis von Octopindehydrogenase (ODH) und Nopalindehydrogenase (NDH) wurde nach der Methode von Otten und Schilperoort (1978) durchgeführt:

10 mg Tumorgewebe, versetzt mit Extraktionspuffer (Vol/Vol) wird sorgfältig mit einem kleinen Spatel in einem Eppendorf-Gefäß zerkleinert.
Extraktionspuffer: 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M Sucrose, 01,% w/v Ascorbinsäure, 0,1% w/v Cysteine-HCl pH 8

Nach Abzentrifugieren in der Eppendorf-Zentrifuge werden 1 - 3 µl des Überstands = Rohextrakt zum direkten Nachweis von Octopin oder Nopalin auf 3MM Whatman elektrophoretisch aufgetrennt.

ODH oder NDH Aktivität wird nach folgendem Enzymtest nachgewiesen:
1 Vol Rohextrakt (frisch hergestellt!) wird mit 1 Vol Inkubationsmix versetzt (t=0) und 1 - 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (t=1, t=1,5).

Inkubationsmix für ODH: 30 mM L-Arginin pH 7, 75 mM NaPyruvat
20 mM NADH (frisch zusetzen),
0,2 M NaPhosphatpuffer pH 7

Inkubationsmix für NDH: 60 mM L-Arginin pH 7, 60 mM α-Ketoglutarat, 16 mM NADH (frisch zusetzen)
0,2 M NaPhosphatpuffer pH 6,8

1-3 µl werden auf 3MM Whatman Papier aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.
Als Marker werden jeweils reines Octopin bzw. Nopalin und als visueller Marker Methylgrün verwendet.

C. 2.14.2 Papierelektrophoretische Auftrennung von Octopin und Nopalin

Ein mit Laufmittel (Ameisensäure:Essigsäure:H_2O = 5:15:80) gesättigtes 3MM Whatman Papier wird luftblasenfrei auf den Mitteltisch einer horizontalen Elektrophoresekammer gelegt, die Enden des Papiers tauchen in das Laufmittel ein. Die Kammer wird abgedeckt und gekühlt (4°C), um Verdunsten des Laufmittels zu verhindern. Dann wird 30 Minuten lang eine Spannung von 200 V (ca. 80 mA) angelegt, um eine homogene Verteilung des Laufmittels im Papier zu erreichen.
Mit einer spitz ausgezogenen Mikropipette tropft man auf der Anodenseite 1-3 µl Rohextrakt oder Probe aus dem Enzymtest auf das Papier auf und legt 1 Stunde 200 V an.
Nach der Elektrophorese werden die überhängenden Papier-Enden abgetrennt, um ein Verlaufen der Flecken zu vermeiden. Das Papier wird auf 3MM Whatman-Filter 30-60 Minuten bei 80°C getrocknet.

Guanidinderivate können daraufhin mit Phenanthrenchinon sichtbar gemacht werden.
Dazu taucht man das Papier kurz in eine frisch angesetzte Lösung aus 1 Vol 0,02% w/v Phenanthrenchinon in EtOH,
1 Vol 10 % w/v NaOH und
60% v/v EtOH.
Nach weiteren 10 - 20 Minuten bei 80°C phosphoreszieren Guanidinderivate (Octopin, Nopalin, Arginin...) unter der UV-Lampe (254 nm).
Ohne UV-Bestrahlung erkennt man auf dem Whatman Papier nur sehr schwer gelbliche bis bläuliche Flecken.

D. Ergebnisse

D. 1. Die 3 Gruppen der Klasse I Stämme

In die Klasse I des Genomumstrukturierungs-Schemas der Rhizobiaceen wurden die onkogenen Agrobacterien und die nicht onkogenen Min-Typ Stämme eingeordnet (Heumann et al. 1983). Diese Einteilung erfolgte aufgrund der Ähnlichkeit von Agrobacterien und Min-Typen im Restriktions-Modifikationssystem, der Sensitivität gegenüber dem Bakteriophagen Ø 18 (Winkler 1984) und dem Restriktionsmuster von Gesamt-DNA und Plasmid-DNA. Morphologisch können die Agrobacterien des Schemas von den Min-Typ Stämmen unterschieden werden (Heumann et al. 1984, Bauer 1981).

In dieser Arbeit wurden das Restriktionsmuster der Gesamt-DNA und der kleinen Plasmide mit dem Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII, sowie die Plasmidverteilung in Rohlysaten (Eckhardt-Simon Methode, vgl. C.2.2.4) der Agrobacterien und Min-Typ Stämme untersucht.

Stellvertretend für alle untersuchten Agrobacterien Stämme des Schemas wurde als Prototyp der Stamm 18-31 verglichen mit A. tumefaciens Stämmen der Phabagen Collection (PC), die mit denselben Methoden parallel präpariert wurden.

D. 1.1 Vergleich der Restriktionsmuster der Gesamt-DNA von Agrobacterium Stämmen des Schemas mit Agrobacterium Stämmen aus der Phabagen Sammlung (PC)

Die Restriktionsmuster der Gesamt-DNA aller untersuchten Agrobacterium Stämme des Schemas sind identisch - unabhängig vom zur Verdauung verwendeten Restriktionsenzym (vgl. Bauer 1981).

Außerdem ist das Restriktionsmuster der Gesamt-DNA dieser Agrobacterien identisch mit dem onkogenen A. tumefaciens Stamm 18-1 von Kocur (CSSR), welcher nach persönlicher Mitteilung mit A. tumefaciens B_6 (ein Octopin Stamm) verwandt sein soll.

Zur Bestimmung des Verwandtschaftsgrades zwischen den Agrobacterien des Schemas und A. tumefaciens B_6 wurden verschiedene Octopin Agrobacterium Stämme aus der PC in die Untersuchung mit einbezogen.

Abb. 2 zeigt das Restriktionsmuster der Gesamt-DNA von A. tumefaciens PC 2500 (B_6), PC 2501 (B_6S_3) und PC 2590 (ACH5) im Vergleich mit dem Agrobacterium Schema-Stamm 18-31. Das Fragmentmuster von 18-31 unterscheidet sich sowohl bei HindIII, als auch bei EcoRI Verdauung deutlich vom Restriktionsmuster der PC Agrobacterium Stämme, während das der PC-Stämme untereinander weitgehend identisch ist.

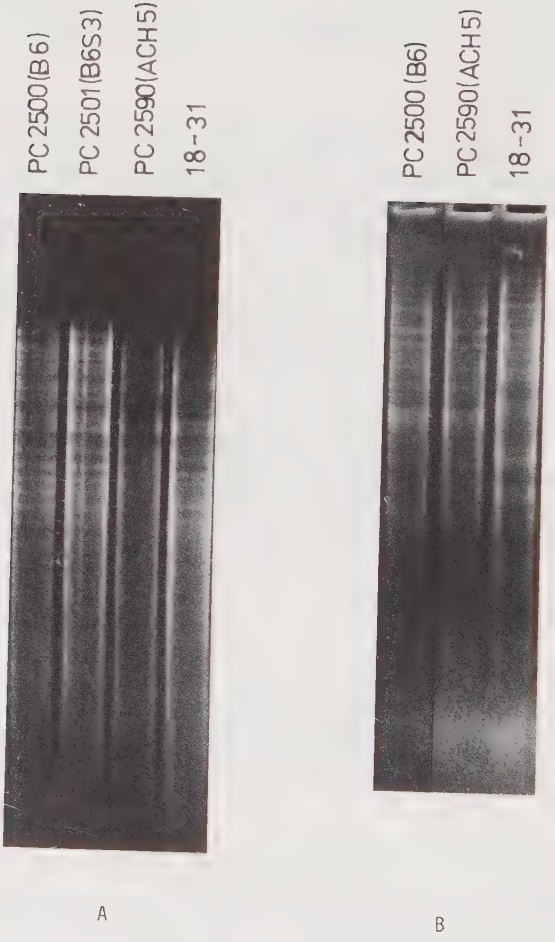


Abb. 2 Verdauung von Gesamt-DNA verschiedener Agrobacterium Stämme aus der PC im Vergleich mit der des Agrobacterium Stammes 18-31

A. HindIII Verdauung von A. tumefaciens PC 2500 (B6), PC 2501 (B_6S_3), PC 2590 (ACH 5) und 18-31

B. EcoRI Verdauung von A. tumefaciens PC 2500 (B6), PC 2590 (ACH 5) und 18-31

D. 1.2 Gesamt-DNA Restriktionsmuster der Min-Typ Stämme (Ia)

In Abb. 3 werden das HindIII und das EcoRI Gesamt-DNA Restriktionsmuster verglichen.
Der Min-Typ 31-1 ist stellvertretend für eine Reihe von 15 untersuchten Min-Typ Stämmen verschiedener Herkunft abgebildet. Der Min-Typ Stamm 31-15 vertritt 2 weitere untersuchte Min-Typ Stämme, die durch Stressbehandlung aus Agrobacterium Schema-Stämmen entstanden sind. Eine kleinere Anzahl aus nicht-nodulierenden Rhizobium japonicum Stämmen entstandenen Min-Typen werden durch 31-35 in der Abb. 3 vertreten.

Bei 31-1, 31-15 und 31-24 traten keine Unterschiede im Gesamt-DNA Restriktionsmuster bei HindIII und EcoRI Verdauungen auf. Diese Min-Typ Stämme wurden zu der Gruppe Iaα zusammengefaßt.
Dagegen erkennt man unschwer, daß der Min-Typ 31-35 ein anderes HindIII und EcoRI Fragmentmuster als 31-1, 31-15 oder 31-24 aufweist. Die Min-Typ Stämme, deren Restriktionsmuster identisch mit 31-35 sind, stellen die Min-Typ Gruppe Iaß dar.
Die Min-Typ Stämme der Gruppe Iaα zeigen bei XhoI Verdauung ein nahezu identisches Fragmentmuster der Gesamt-DNA mit den Agrobacterium Stämmen (Ib), siehe Abb. 4. Dieses Ergebnis verdeutlicht die sehr nahe Verwandtschaft der Agrobacterien (Ib) und der Min-Typ Gruppe Iaα.

Abb 3 Verdauung von Gesamt-DNA der Min-Typ Stämme 31-1, 31-15, 31-24 der Gruppe Iaα und 31-35 der Gruppe Iaß

A. HindIII Verdauung

B. EcoRI Verdauung

Abb. 4 XhoI-Verdauung von Gesamt-DNA der Min-Typ Stämme 31-15 (Bahn 1+2), 31-4 (Bahn 3+4) und 31-16 (Bahn 5+6) sowie der Agrobacterium Stämme 18-31 (Bahn 7+8), 18-30 (Bahn 9+10) und 18-1 (Bahn 11+12).

D. 1.3 Plasmid-Vergleich der Agrobacterium Stämme

In Rohlysaten der Agrobacterium Stämme des Schemas findet man in TB-Agarosegelen nach Eckhardt-Simon (C.2.2.4) drei Plasmid-Banden (Abb. 5):
Das größte Plasmid ist ca. 300 Md groß (p300), die nächstkleineren Plasmide erscheinen als Doppelbande mit ca. 140 und 126 Md (p140, p126) (Heumann et al. 1984). Bei der dritten Bande handelt es sich ebenfalls um ein Doppelplasmid (pAT + pMT) wie im Laufe der Arbeit noch nachgewiesen wird.

In den A. tumefaciens Stämmen der PC lassen sich zwei Plasmidbanden nachweisen. Die größere Bande gehört zu einem kryptischen ca. 300 Md großen Plasmid, das sich in allen untersuchten PC Agrobacterium Stämmen und in allen Agrobacterium Stämmen des Schemas darstellen lassen.
Diese 300 MD Plasmide sind bisher noch nicht charakterisiert worden.
Die zweite Plasmidbande entspricht bei A. tumefaciens ACH 5 dem Ti-Plasmid. Bei A. tumefaciens B_6 und B_6S_3 setzt sich die zweite Bande aus dem Ti-Plasmid und einem etwas kleineren Plasmid zusammen.
Plasmide von ca. 20 Md Größe lassen sich in den untersuchten PC Agrobacterium Stämmen nicht nachweisen.

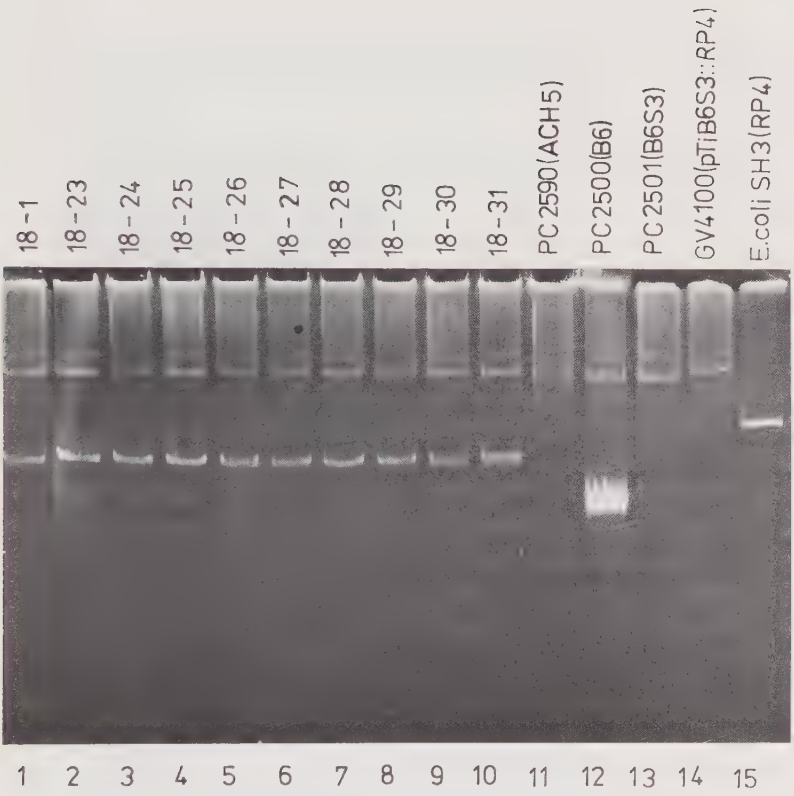


Abb. 5 Plasmide der Agrobacterium Stämme des Schemas im Vergleich mit Agrobacterium Stämmen aus der PC
(Darstellung der Plasmide nach Eckhardt-Simon C.2.2.4)
Bahn 1 -10: Agrobacterium Stämme aus dem Schema
Bahn 11-13: Agrobacterium Stämme aus der PC
Bahn 14 : A. tum. GV4100($pTiB_6S_3$::RP_4) mit zwei Plasmiden von ca. 300 Md und 156 Md (Holsters et al. 1978)
Bahn 15 : E. coli SH3(RP4) mit RP4 von 38 Md als Größenvergleich (Burkardt et al. 1979).

D. 1.4 Plasmide der Min-Typ Stämme (Ia)

Die Min-Typ Stämme (Ia) können nach den Ergebnissen der Restriktions- und Plasmidanalyse in zwei Gruppen Iaα und Iaß unterteilt werden.

In Rohlysaten von Min-Typ Stämmen Iaα findet man 1-3 Plasmide (Abb. 6):

in 31-1	300 Md
in 31-15	300 Md, 24 Md (pMT)
in 31-24	300 Md, 24 Md (pMT) und ein sehr kleines Plasmid, das nur bei 31-24 gefunden wurde.

Die Plasmide mit ca. 300 Md und 24 Md (pMT) sind auch in allen untersuchten Agrobacterium Stämmen (Ib) des Schemas vorhanden. Das XhoI Restriktionsmuster der Gesamt-DNA von Min-Typ Stämmen (Iaα) und Agrobacterium Stämmen (Ib) sind nahezu identisch (vgl. Abb. 4). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Min-Typ Stämme Iaα direkt aus Agrobacterien (Ib) durch Verlust von 3 Plasmiden (140 Md, 126 Md, 23 Md = pAT) oder 4 Plasmiden 140 Md, 126 Md, 24 Md = pMT, 23 Md = pAT) entstanden sind.

Die zweite Min-Typ Gruppe Iaß unterscheidet sich im Restriktionsmuster der Gesamt-DNA (vgl. Abb. 3) und im Plasmid-Muster (vgl. Abb. 6) von den Min-Typen Iaα und von den Agrobacterium Stämmen (Ib).
Bei der Iaß-Gruppe kommen immer zwei dicht zusammenliegende Plasmide vor, deren Molekulargewicht größer als 100 Md ist (Abb. 6). Zusätzliche größere oder kleinere Plasmide konnten in dieser Gruppe nicht nachgewiesen werden.

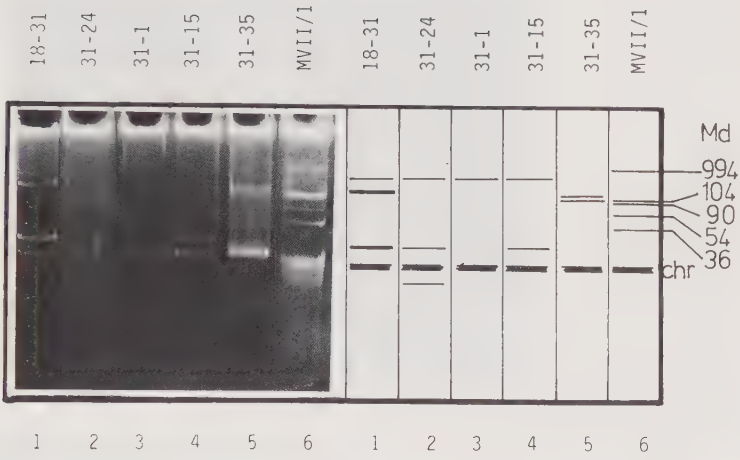


Abb. 6 Plasmide der Min-Typ Stämme Ia des Schemas
(Darstellung der Plasmide nach Eckhardt-Simon C.2.2.4)
Bahn 1 : Agrobacterium Schema Stamm 18-31 (Ib)
Bahn 2-4: Min-Typ Stämme Iaα
Bahn 5 : Min-Typ Stämme Iaß
Bahn 6 : Rhizobium meliloti MVII/1 mit 5 Plasmiden bekannter Größe als Längenstandard: 994, 104, 90, 54 und 36 Md (B. Burkardt 1984, D. Horn 1981).

D. 1.5 Restriktionsmuster der kleinen Plasmide von Agrobacterium (Ib) und Min-Typ Stämmen (Iaα)

In Abb. 7 sind die HindIII und EcoRI Verdauungen von pAT + pMT einiger Agrobacterium (Ib) und pMT einiger Min-Typ Stämme (Iaα) des Schemas dargestellt.

Die pAT + pMT Verdauungen verschiedener Agrobacterien Stämme sind identisch. Bei pMT Verdauung verschiedener Min-Typ Stämme treten ebenfalls stets identische Fragmentmuster auf.

Vergleicht man die HindIII oder EcoRI Fragmentmuster von pAT + pMT mit den Verdauungen von pMT, so erkennt man, daß die pMT Fragmente sowohl in den Agrobacterien als auch in den Min-Typen vorhanden sind.
Die zusätzlichen Banden der pAT + pMT Verdauungen kann man demzufolge dem Agrobacterium spezifischen Plasmid pAT zuordnen.

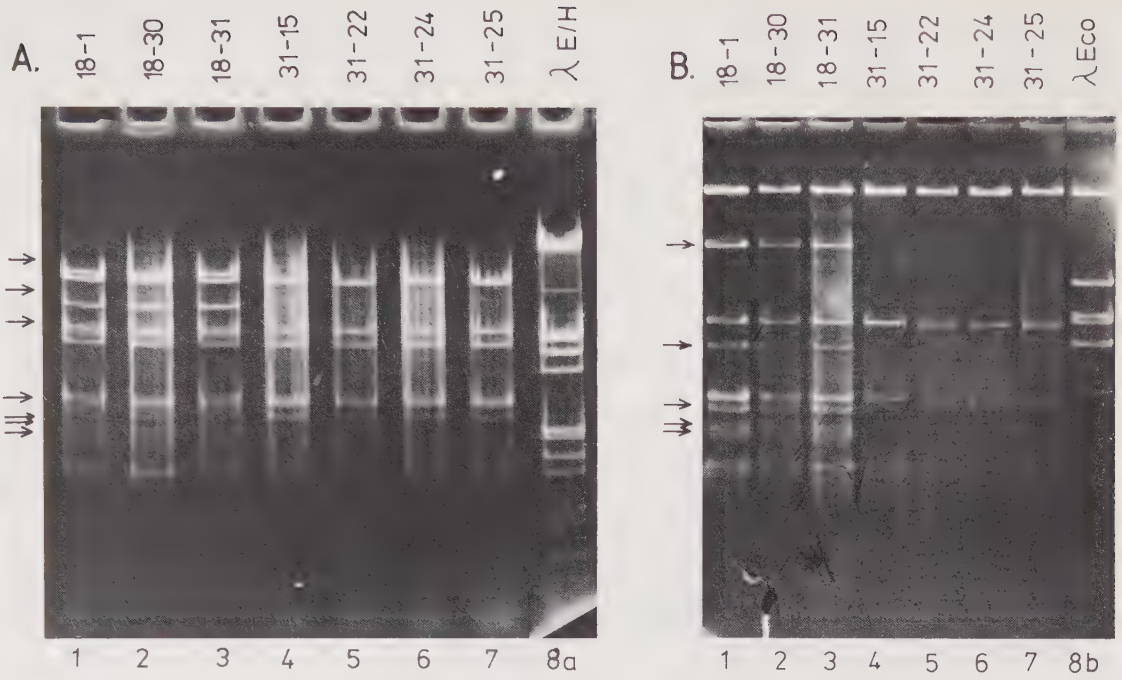


Abb. 7 Verdauung der kleinen Plasmide der Klasse I mit HindIII (A) und EcoRI (B).
Bahn 1-3: pAT+pMT der Agrobacterium Stämme 18-1, 18-30 und 18-31
Bahn 4-7: pMT der Min-Typ Stämme 31-15, 31-22, 31-24 und 31-25
Bahn 8 : λ/EcoRI+HindIII (a) und λ/EcoRI (b) Fragmente als Größenmarker

Die Pfeile deuten auf pAT spezifische Fragmente hin!

D. 2. DNA-Dichten der kleinen Plasmide

In Abb. 8 sind die Dichteprofile von pAT + pMT einiger Agrobacterium Stämme (Ib) des Schemas und pMT einiger Min-Typ Stämme (Iaα) dargestellt. Die DNA-Dichte der kleinen Plasmide wurde durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation in der Analytischen Ultrazentrifuge bestimmt.

Bei pMT der Min-Typ Stämme ist das Dichteprofil stets symmetrisch. Als DNA-Dichte wurde für pMT 1,716g/cm^3 berechnet.

Der pAT + pMT Dichtegipfel ist unsymmetrisch und andeutungsweise zweigipfelig, was auf zwei nah beisammenliegende Plasmid-Dichten von 1,714 g/cm^3 für pAT und 1,716 g/cm^3 für pMT der Agrobacterium Stämme hinweist.

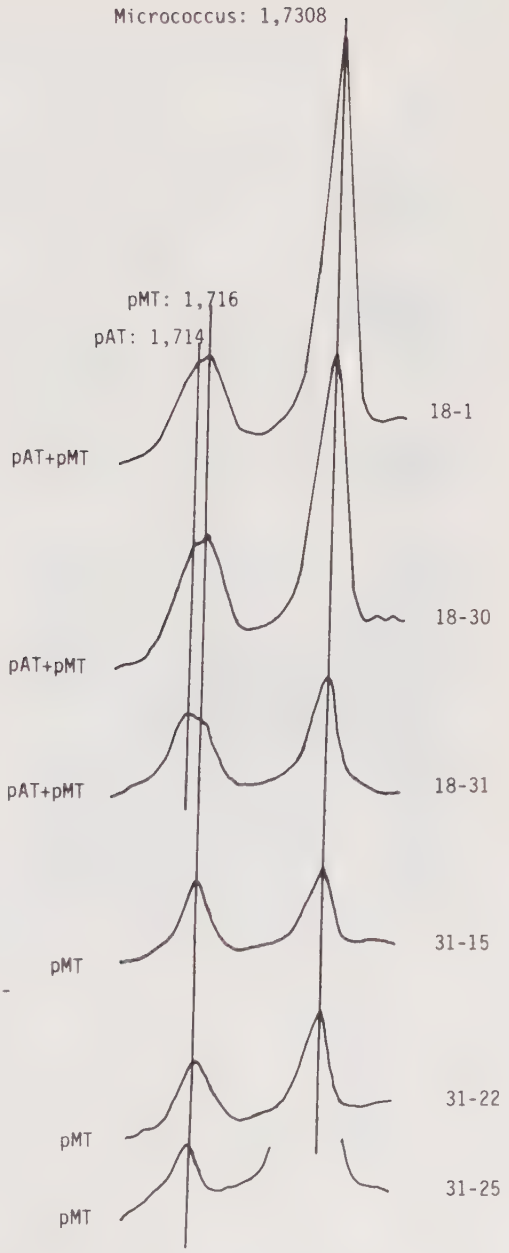


Abb. 8

Plasmid-DNA Dichteprofile von 18-1, 18-30 und 18-31, sowie 31-15, 31-22 und 31-25.
Als Referenz wurde Micrococcus DNA der Dichte 1,7308 g/cm³ verwendet.

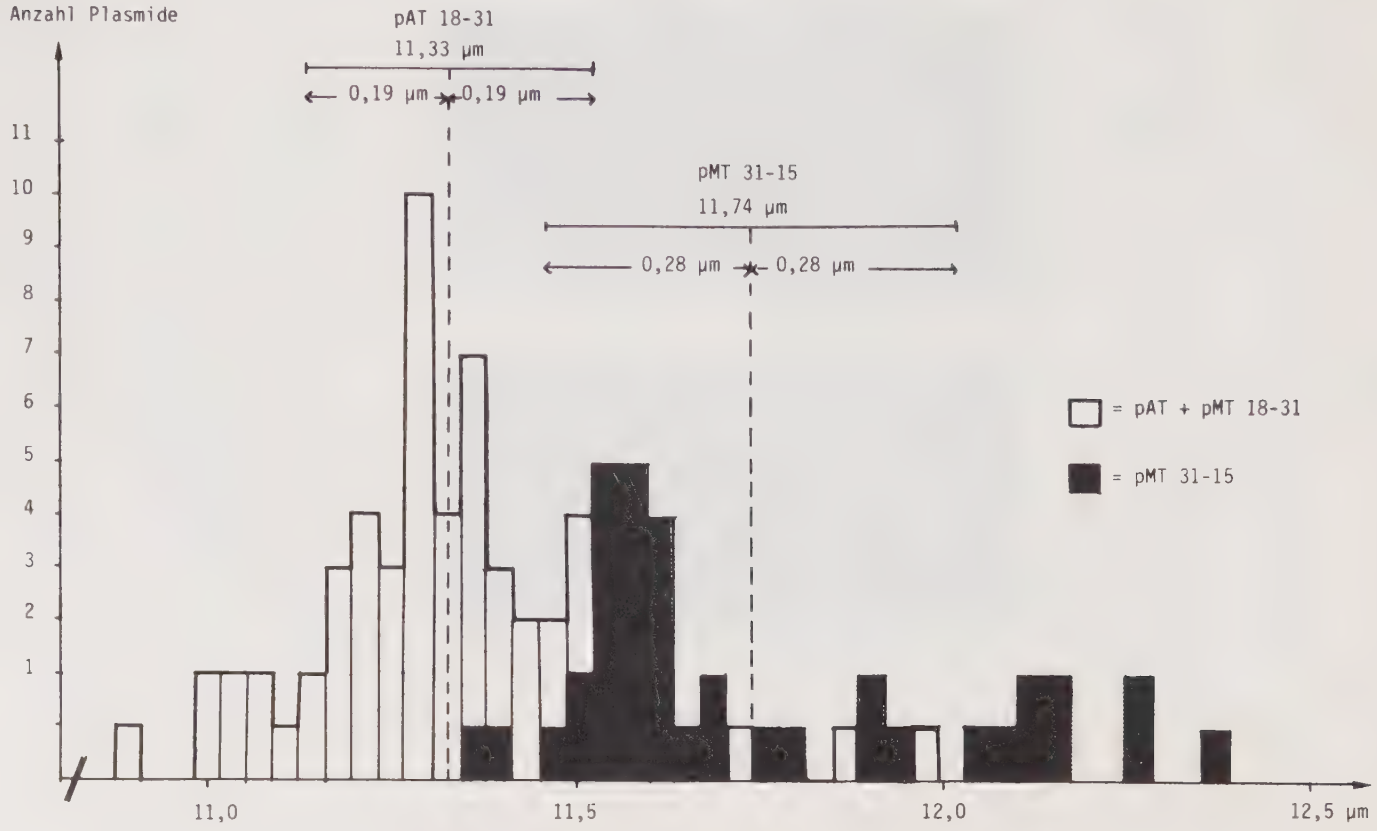
D. 3 Elektronenmikroskopische Längenbestimmung von pMT 31-15, pMT 18-31 und pAT 18-31

Die kleinen Plasmide von Agrobacterium 18-31, pAT + pMT 18-31 erscheinen im TB-Agarosegel (vgl. C.2.2.4.) meist als eine Bande, die auf gleicher Höhe mit pMT 31-15 liegt (Abb. 6).

Um die exakte Länge von PMT 31-15 zu bestimmen, wurden 39 Moleküle pMT 31-15 im Elektronenmikroskop vermessen (vgl. C.2.10). Da pMT 31-15 homolog ist mit pMT 18-31 (siehe auch S. 43) konnte so auf indirekte Weise auch die Größe von pMT 18-31 bestimmt werden. Die gemittelte Plasmidlänge von pMT 31-15 und pMT 18-31 beträgt 11,74 µm ± 0,28 µm (Mittelwert mit Standardabweichung).

Um die DNA-Länge von pAT 18-31 zu bestimmen, wurden 69 Moleküle pAT + pMT 18-31 vermessen. Die ermittelten Längenwerte wurden gegen die Anzahl der Plasmide graphisch aufgezeichnet (Abb. 9). Da die Werte von pMT 31-15 und pMT 18-31 überlappen, kann der zweite Gipfel der Kurve pAT 18-31 zugeordnet werden.
Die mittlere Molekülläge von pAT 18-31 beträgt 11,33 µm ± 0,19 µm. Da pMT 18-31 verglichen mit pAT 18-31 bei den EM-Präparationen in deutlich geringerer Kopienzahl vorlag, konnte dieser Mittelwert aus der Summe der Längen von pAT + pMT 18-31, dividiert durch die Anzahl der vermessenen Plasmiden (pAT + pMT), gebildet werden.

Abb.9 Elektronenmikroskopische Längenmessung von pMT 31-15 und pAT + pMT 18-31



D. 4 Vergleich der Restriktionsmuster der kleinen Plasmide von 18-31 und 31-15

DNA-Dichte sowie Molekulargewicht von pAT 18-31 und pMT 18-31 sind sehr ähnlich. Die präparative Trennung der beiden Plasmide aufgrund dieser fast identischen physikalischen Eigenschaften war daher nicht möglich.

Zur Beantwortung der Frage nach der Homologie zwischen pMT 18-31 und pMT 31-15 wurde zunächst die vergleichende Restriktionsanalyse von pMT 31-15 mit pAT + pMT 18-31 gewählt. Verdauungen von pAT + pMT 18-31 und pMT 31-15 mit den Enzymen HindIII, EcoRI, PstI und BamHI (Abb. 10) ergaben, daß bei den pAT + pMT 18-31 Spaltungen stets mit pMT 31-15 identische Banden auftreten, das heißt, daß diese gemeinsamen Fragmente pMT 18-31, die restlichen Fragmente folglich pAT 18-31 zuzuordnen sind.

Das Densitogramm der EcoRI Verdauung von pAT + pMT 18-31 und pMT 31-15 in Abb. 11 zeigt deutlich die Übereinstimmung der pMT 18-31 und pMT 31-15 Fragmentgrößen.

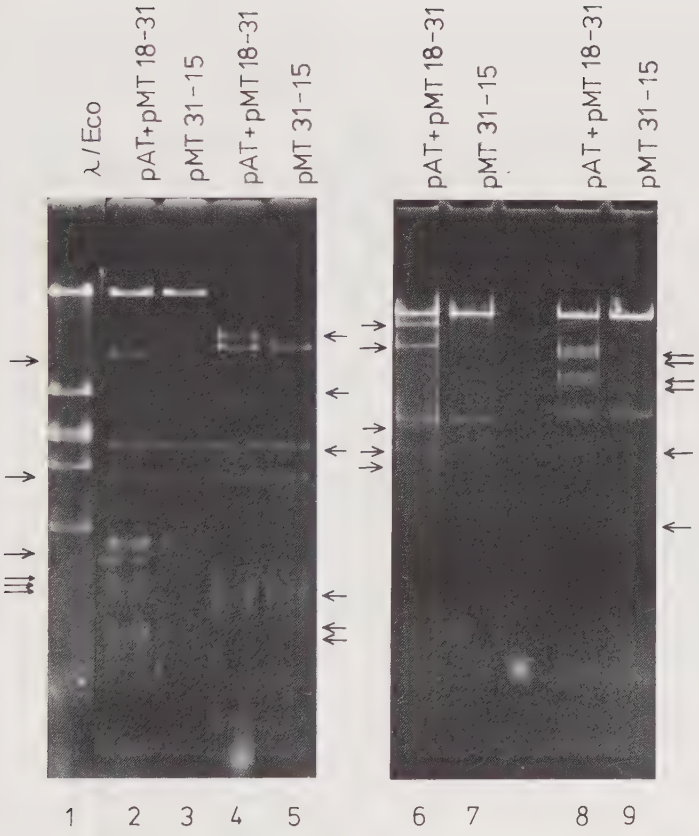


Abb. 10 Verdauung von pAT+pMT 18-31 und pMT 31-15 mit EcoRI (Bahn 2 und 3), HindIII (Bahn 4 und 5), PstI (Bahn 6 und 7) und BamHI (Bahn 8 und 9).

λ/EcoRI Fragmente als Längenstandard (Bahn 1).

Pfeile: pAT 18-31 spezifische Banden!

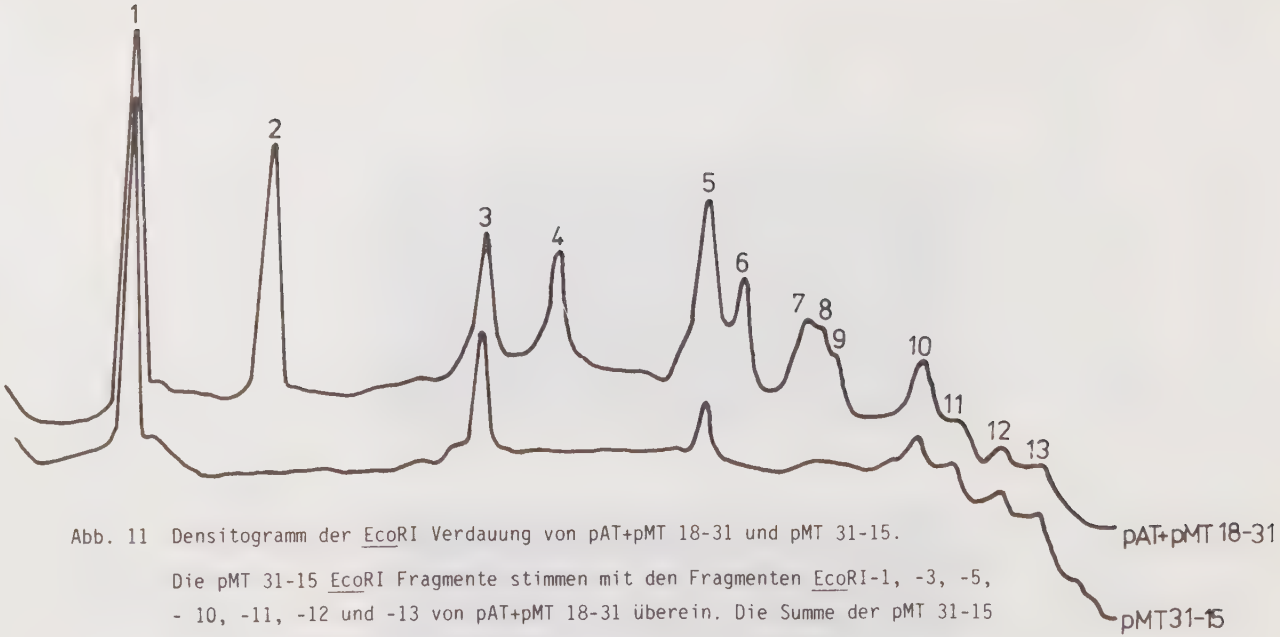


Abb. 11 Densitogramm der EcoRI Verdauung von pAT+pMT 18-31 und pMT 31-15.

Die pMT 31-15 EcoRI Fragmente stimmen mit den Fragmenten EcoRI-1, -3, -5, - 10, -11, -12 und -13 von pAT+pMT 18-31 überein. Die Summe der pMT 31-15 EcoRI Fragmente ergibt eine Größe von 21,5 Md (Kutz 1984).
Die Fragmente pAT+pMT 18-31 EcoRI-2, -4, -5 (Doppelbande), -6, -7, -8, -9 und -10 (Doppelbande) gehören zu pAT 18-31. Die Summe der pAT 18-31 EcoRI Fragmente ergibt eine Größe von 24,4 Md (Kutz 1984).

D. 5. Homologie von pMT 31-15 und pMT 18-31

Um die Homologie zwischen pMT 31-15 und pMT 18-31 nachzuweisen, wurde ^{32}P-markierte pMT 31-15 DNA unter stringenten Bedingungen mit verdauter pAT + pMT 18-31 DNA hybridisiert. Abb. 12 zeigt die Agarosegelelektrophorese EcoRI-, HindIII- und PstI- verdauter pAT + pMT 18-31 und pMT 31-15 DNA sowie das Autoradiogramm nach Hybridisierung mit ^{32}P-markierter pMT 31-15 DNA. Danach sind pMT 31-15 und pMT 18-31 in allen Fragmenten homolog.

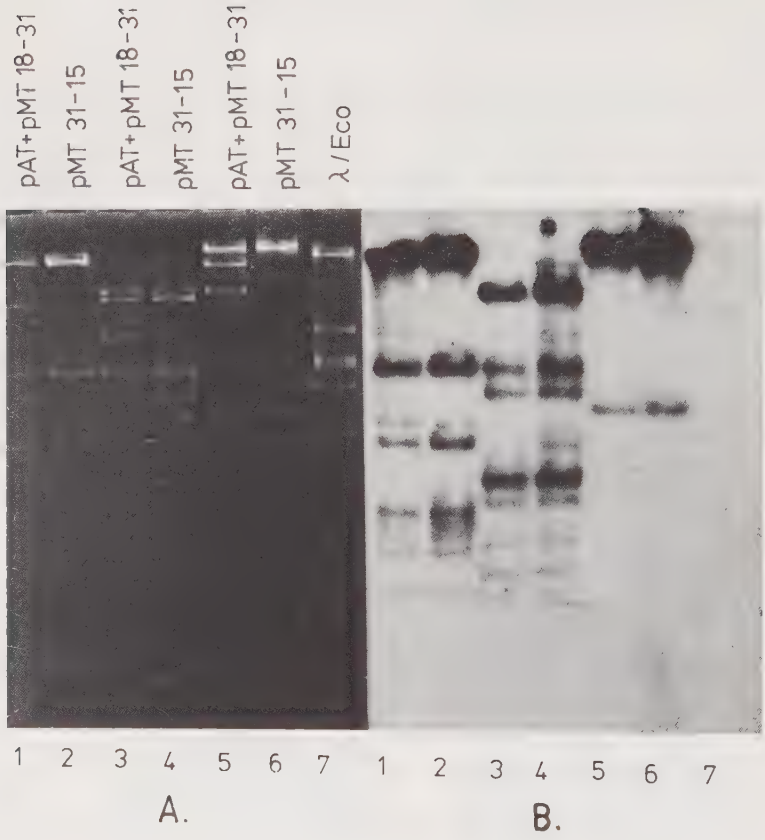


Abb. 12

A. Agarosegelelektrophorese EcoRI (Bahn 1 und 2), HindIII (Bahn 3 und 4) und PstI (Bahn 5 und 6) verdauter pMT 31-15 und pAT+pMT 18-31 DNA λ/EcoRI Längenstandard (Bahn 7)

B. Autoradiogramm nach Hybridisierung mit ^{32}P-markierter pMT 31-15 DNA Hybridisierungsbedingungen: 50% Formamid, 44°C

D. 6. Hybridisierungsversuche mit T-DNA aus pTiACH 5

Die Agrobacterium Stämme des Schemas sind verglichen mit den PC Agrobacterien besonders virulent:
Infiziert man z.B. Kartoffelscheiben mit den Agrobacterien, so sieht man bei den Agrobacterium Schema-Stämmen bereits nach 6 Tagen Tumore, während bei den Agrobacterien der PC erst nach ca. 14 Tagen kleinere Wucherungen auftreten (vgl. auch Seite 66).

Wo sitzt die genetische Information der Onkogenität in den Agrobacterium Stämmen des Schemas? Ist diese Information homolog zur "core-T-DNA" der Octopin und Nopalin Ti-Plasmide?

Zur Klärung dieser Fragen wurde sowohl die Gesamt-DNA als auch die Plasmid-DNA der Agrobacterium Schema-Stämme mit der ^{32}P-markierten "core-T-DNA" von pTiACH 5 aus A. tumefaciens ACH 5 hybridisiert.

Abb. 33 (Seite 82) zeigt die Restriktionskarte der T-Region des Octopin Plasmids pTiACH 5, aus dem das in pBR 322 klonierte BamHI-8 (pGV 0153) und HindIII-1 (pGV 0201) Fragment (De Vos et al. 1981) als radioaktive Proben verwendet wurden. In den Hybridplasmiden pGV 0153 und pGV 0201 ist die gesamte T_L-DNA von pTiACH 5 kloniert.

Im Folgenden werden vornehmlich Hybridisierungversuche mit pGV 0201 besprochen. In Abb. 13 ist die Restriktionskarte von pGV 0201 mit Fragmenten der rechten Seite der T_L-DNA und einem kleinen Stück der linken Seite der T_R-DNA von pTiACH 5 dargestellt.

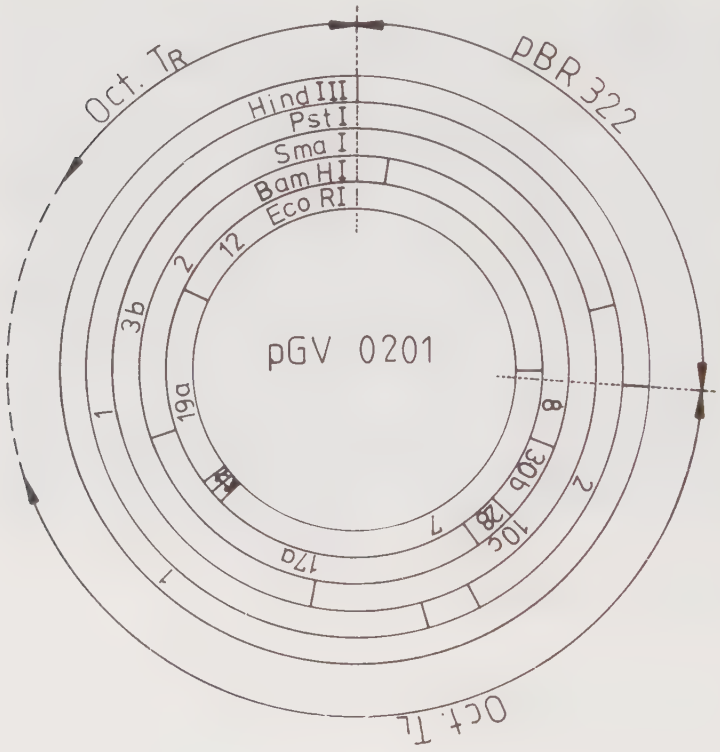


Abb. 13 Restriktionskarte von pGV 0201 für die Enzyme HindIII, PstI, SmaI, BamHI und EcoRI (nach De Vos et al. 1981)
Die gestrichelte Linie zwischen Oct. T_L- und T_R-DNA weist auf unterschiedliche Endpunkte der T-DNA in verschiedenen Tumorlinien hin.

D. 6.1 Hybridisierung von Gesamt-DNA aller Klassen der Schema-Stämme mit pGV 0201 und pGV 0153

Zur Überprüfung der Homologie zwischen der DNA der 5 Klassen der Schema-Stämme und der T-DNA von pTiACH 5 wurde zunächst die Gesamt-DNA aus allen 5 Klassen des Rhizobium trifolii Schemas mit Restriktionsenzymen (meist EcoRI und HindIII) verdaut, nach Southern (1975) auf NC transferiert und die NC-Filter mit ^{32}P-markiertem pGV 0201, pGV 0153 und pBR 322 (Vektorkontrolle) unter stringenten Bedingungen hybridisiert (Abb. 14 und 15).

Unter dieser Stringenz traten nur in den Agrobacterium Stämmen des Schemas homologe Banden im Autoradiogramm auf, nicht jedoch in der DNA der anderen vier Klassen (nicht abgebildet).

Einige bei der Klasse III (nif-Typ) gefundenen Banden konnten auf Homologie mit dem Vektor pBR 322 von pGV 0201 und pGV 0153 zurückgeführt werden. Nach D. Schillik (1983) beruht diese Hybridisierung auf einer Homologie zwischen dem Tetracyclinresistenzgen von pBR 322 und der DNA der nif-Typ Stämme.

Die Hybridisierungsversuche mit der Gesamt-DNA der verschiedenen Klassen wurden unter relaxierenden Bedingungen wiederholt. Es konnten jedoch auch da nur bei den Agrobacterium Stämmen des Schemas mit T-DNA homologe Fragmente nachgewiesen werden.

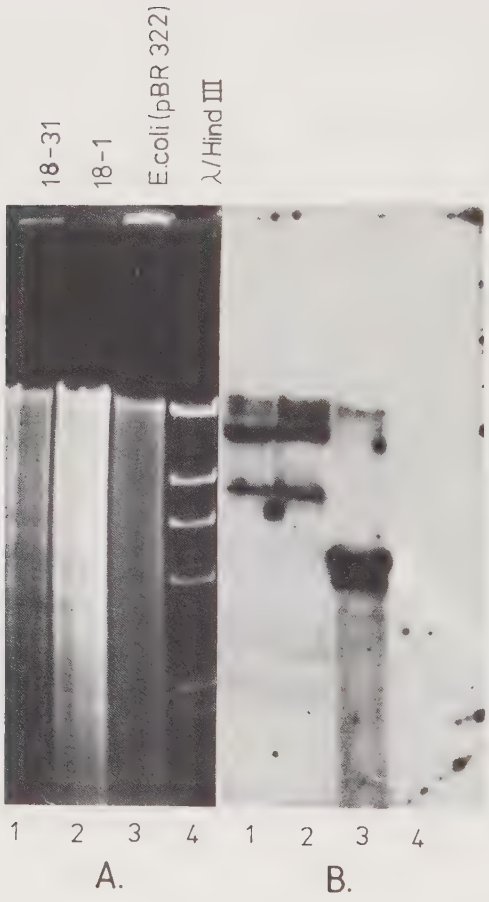


Abb. 14 Hybridisierung mit pGV 0201

A. Agarosegelelektrophorese EcoRI verdauter Gesamt-DNA der Agrobacterium Stämme 18-31 (Bahn 1) und 18-1 (Bahn 2), sowie XhoI verdaute Gesamt-DNA von E. coli HB 101 (pBR 322) (Bahn 3).
λ/HindIII Fragmente als Längenstandard (Bahn 4).

B. Autoradiogramm nach Hybridisierung mit ^{32}P-markierter pGV 0201 DNA.

Hybridisierungsbedingungen: 50% Formamid, 45°C.

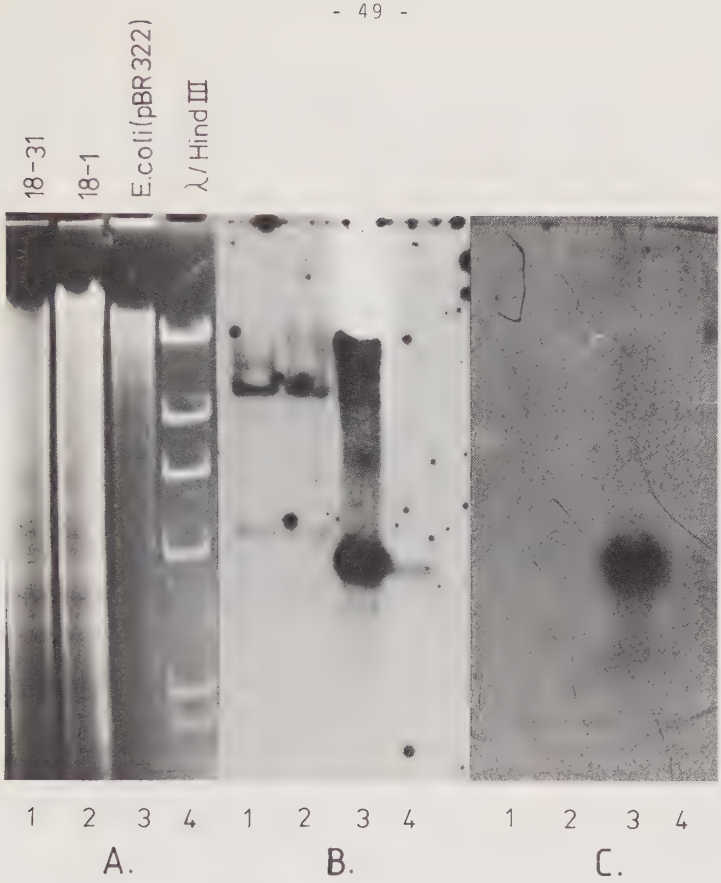


Abb. 15 Hybridisierung mit pGV 0153

A. Agarosegelelektrophorese EcoRI verdauter Gesamt-DNA der Agrobacterium Stämme 18-31 (Bahn 1) und 18-1 (Bahn 2), sowie XhoI verdaute Gesamt-DNA von E. coli HB 101 (pBR 322) (Bahn 3).
λ/HindIII Fragmente als Längenstandard (Bahn 4).

B. Autoradiogramm nach Hybridisierung mit ^{32}P-markierter pGV 0153 DNA.

C. Autoradiogramm nach Hybridisierung des gleichen NC-Filters mit ^{32}P-markierter pBR 322 DNA (Vektor-Kontrolle).

Hybridisierungsbedingungen: 50% Formamid, 45°C.

D. 6.2 Homologie-Untersuchungen zwischen Plasmid-DNA der Klasse I des Schemas und T-DNA: pGV0153, pGV 0201 und pGV 0201/HindIII-1

In Abschnitt D.6.1 wurde gezeigt, daß pGV 0153 und pGV 0201 (pTiACH 5/BamHI-8 und pTiACH 5/HindIII-1; De Vos et al. 1981) mit verdauter Gesamt-DNA der Agrobacterium Stämme des Schemas Homologie zeigen.

Es verbleibt die Frage, ob die homologe DNA-Region in der chromosomalen oder in der Plasmid-DNA der Agrobacterium Stämme des Schemas lokalisiert werden kann.
Dazu wurden die Plasmide aus Rohlysaten (Eckhardt-Simon-Lyse, C.2.2.4) aufgetrennt, auf NC-Filter transferiert und unter stringenten Bedingungen gegen T-DNA hybridisiert.

Mit ^{32}P-markiertem pGV 0153 (keine Abbildung) war auf den Autoradiogrammen nur schwache Homologie mit der Doppelbande der großen Plasmide (vgl. Abb. 5) zu finden.
Hybridisierung mit pGV 0201 (Abb. 16) hingegen ergab bei der Doppelbande der großen Plasmide und bei der Doppelbande der kleinen Plasmide pAT + pMT der Agrobacterium Stämme des Schemas eine Schwärzung auf dem Autoradiogramm.

Da bei den kleinen Plasmiden (pMT) der Min-Typ Gruppe Iaα (ausschließlich pMT!) keine Homologie mit pGV 0201 unter denselben stringenten Bedingungen zu finden war, konnte davon ausgegangen werden, daß die T-DNA auch homolog mit pAT der Agrobacterium Stämme (pAT + pMT!) ist.

Als Kontrolle diente pBR 322, der Vektor der Hybridplasmide pGV 0153 und pGV 0201. ^{32}P-markierte pBR 322 DNA wurde unter denselben stringenten Bedingungen mit Plasmid-DNA der Agrobacterium Stämme des Schemas hybridisiert. Es konnte keine Homologie zum Vektor gefunden werden.

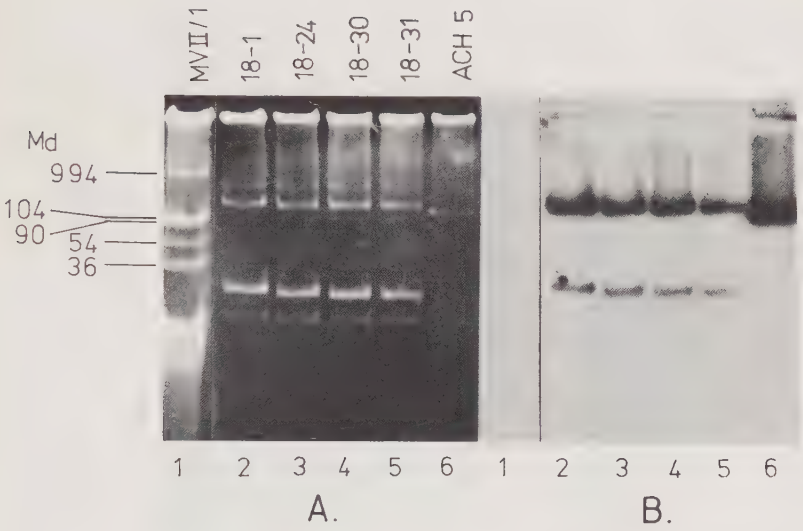


Abb. 16 Hybridisierung mit pGV 0201

A. Agarosegelelektrophorese von Plasmid-DNA aus Rohlysaten (Eckhardt-Simon-Lyse C.2.2.4) der Agrobacterium Stämme 18-1 (Bahn 2), 18-24 (Bahn 3), 18-30 (Bahn 4) und 18-31 (Bahn 5). Rhizobium meliloti MVII/1 mit 5 Plasmiden bekannter Größe: 36, 54, 90, 104 und 994 Md (Horn 1981, B. Burkardt 1984) (Bahn 1) als Längenstandard.
A. tumefaciens ACH 5 (Bahn 6).

B. Autoradiogramm nach Hybridisierung mit ^{32}P-markierter pGV 0201 DNA.
Hybridisierung mit pTiACH 5 (Bahn 6) der Größe von 121 Md (Genetello et al. 1977) als Positiv-Kontrolle.

Hybridisierungsbedingungen: 50% Formamid, 45°C.

Um den homologen Bereich von pAT und dem HindIII-1 Fragment aus pGV 0201 einzugrenzen und die optimalen Hybridisierungsbedingungen zwischen den beiden Plasmiden zu finden, wurde pAT + pMT des Agrobacterium Stammes 18-31 mit BamHI verdaut und gegen das ^{32}P-markierte HindIII-1 Fragment aus pGV 0201 unter verschiedenen stringenten und relaxierenden Versuchsbedingungen hybridisiert (Abb. 17 A).

5 X SSC, 44°C und 20-30% Formamid in der Hybridisierungslösung führten zur Schwärzung des Autoradiogramms im Bereich des Fragments BamHI-2 von pAT + pMT 18-31.
Bei 40% Formamid war die Hybridisierung sehr schwach, unter sehr relaxierenden Bedingungen mit 10% Formamid wurde die Hybridisierung unspezifisch.

Die Vektorkontrolle mit ^{32}P-markiertem pBR 322 (Abb. 17 B) wurde unter den relaxierendsten Bedingungen mit 10% Formamid durchgeführt. Sie ergab Homologie mit dem BamHI-6 Fragment von pAT + pMT 18-31. Dieses Fragment gehört zu pMT 18-31 (vgl. Abb. 10).

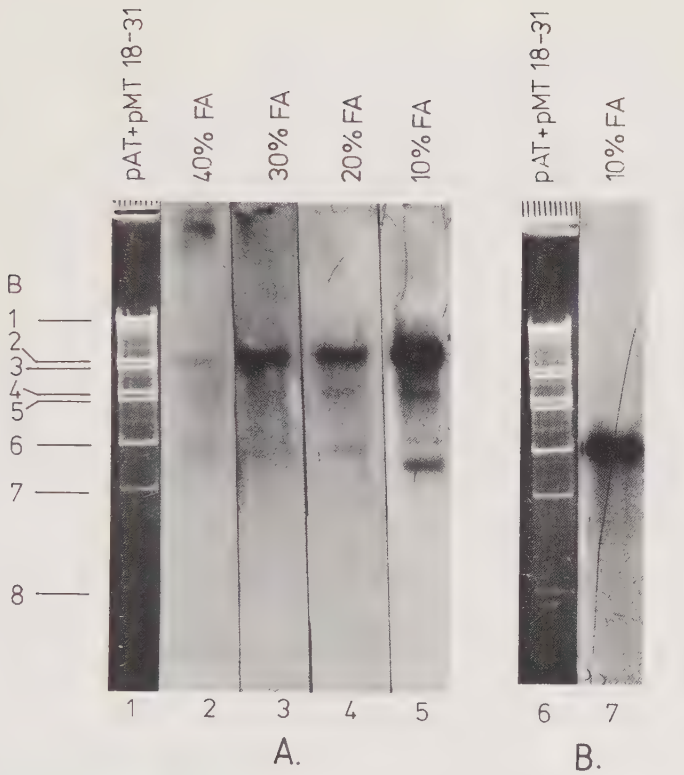


Abb. 17 A. Hybridisierung mit pGV 0201/HindIII-1 Fragment

Bahn 1 : Agarosegelelektrophorese von pAT+pMT 18-31/BamHI

Bahn 2-5 : Autoradiogramm nach Hybridisierung mit pGV 0201/ HindIII-1 Fragment mit 40%, 30%, 20% und 10% Formamid in der Hybridisierungslösung.

B. Hybridisierung mit pBR 322 (Vektorkontrolle)

Bahn 6 : Agarosegelelektrophorese von pAT+pMT 18-31/BamHI

Bahn 7 : Autoradiogramm nach Hybridisierung mit pBR 322 mit 10% Formamid in der Hybridisierungslösung.

Weitere Hybridisierungsbedingung: 44°C.

D. 6.3 pAT 18-31/BamHI - Klonierung

Um sicherzustellen, daß die Homologie des HindIII-1 Fragments von pGV 0201 dem Fragment BamHI-2 und nicht dem sehr nahe liegenden Fragment BamHI-3 (vgl. Abb. 17) von pAT + pMT 18-31 zuzuordnen ist, wurden die pAT 18-31/BamHI Fragmente kloniert.

Die Klonierung erfolgte mit Hilfe von pBR 322 als Vektor (Abb. 18). Die BamHI-Fragmente von pAT 18-31 wurden in die BamHI Schnittstelle von pBR 322 einligiert (Abb. 18 und Abb. 19), die im Tetracyclin-Resistenzgen liegt. Die Klone wurden nach Ampicillin-Resistenz und Tetracyclin-Sensitivität selektioniert.

Die Hybridplasmide einer Auswahl selektionierter Klone wurden nach der Eckhardt-Simon-Methode (C.2.2.4) dargestellt (Abb. 20), Klone mit unterschiedlich großen Hybridplasmiden wurden herausgesucht, die Plasmide nach Birnboim und Doly (1979) isoliert und mit BamHI verdaut (Abb. 21).
Die auf diese Weise gefundenen Hybridplasmide pIB 1-6 tragen die pAT + pMT / BamHI Fragmente 2, 3, 4, 5, 7 und 8, die zu pAT 18-31 gehören (vgl. auch Abb. 10):

Hybridplasmide:

pIB 1 : Vektor mit BamHI-2 Fragment aus pAT + pMT 18-31
pIB 2 : " " BamHI-3 " " "
pIB 3 : " " BamHI-4 " " "
pIB 4 : " " BamHI-5 " " "
pIB 5 : " " BamHI-7 " " "
pIB 6 : " " BamHI-8 " " "

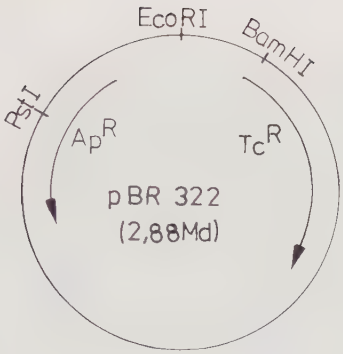


Abb. 18 Restriktionskarte des Klonierungsvektors pBR 322 (nach Bolivar et al. 1977)

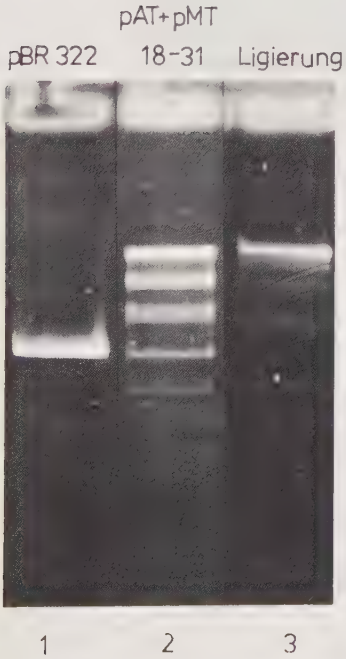


Abb. 19

pAT 18-31/BamHI Klonierung

Bahn 1: pBR 322/BamHI, BAP
Bahn 2: pAT+pMT 18-31/BamHI
Bahn 3: Ligierung von pBR 322 mit pAT+pMT 18-31 Fragmenten.

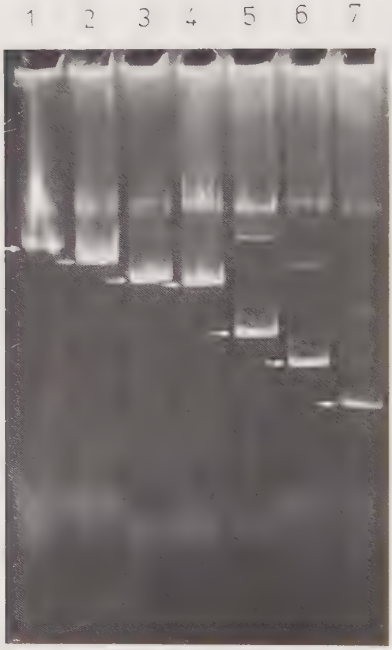


Abb. 20 Eckhardt-Simon-Lyse der E. coli HB 101 Klone mit den Hybridplasmiden pIB 1-6

Bahn 1: pIB 1
Bahn 2: pIB 2
Bahn 3: pIB 3
Bahn 4: pIB 4
Bahn 5: pIB 5
Bahn 6: pIB 6
Bahn 7: pBR 322

Die Pfeile zeigen auf die ccc-DNA der jeweiligen Plasmide.

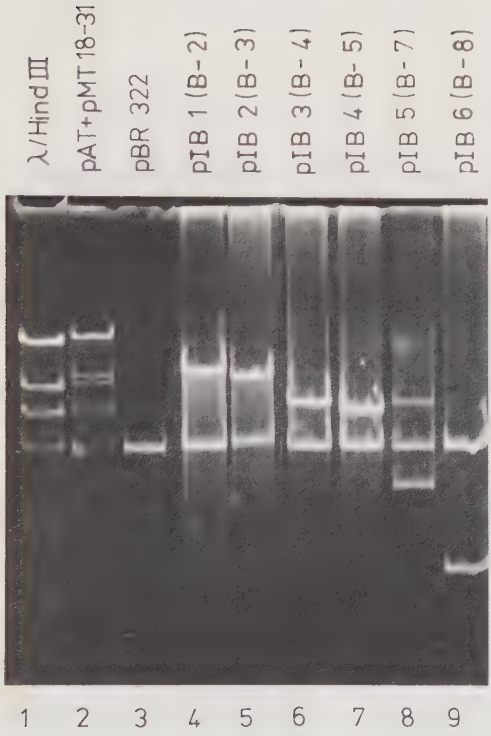


Abb. 21 BamHI-Klonierung von pAT 18-31

Bahn 1: λ/HindIII Fragmente als Längenstandard
Bahn 2: pAT+pMT 18-31/BamHI Verdauung
Bahn 3: pBR 322/BamHI Verdauung (Vektor linearisiert)
Bahn 4-9: BamHI-Verdauung von pIB 1-6, (B = BamHI)

Bahn 4: pIB 1 mit pAT 18-31/B-2 Fragment klon. in pBR 322
Bahn 5: pIB 2 " pAT 18-31/B-3 " " " "
Bahn 6: pIB 3 " pAT 18-31/B-4 " " " "
Bahn 7: pIB 4 " pAT 18-31/B-5 " " " "
Bahn 8: pIB 5 " pAT 18-31/B-7 " " " "
Bahn 9: pIB 6 " pAT 18-31/B-8 " " " "

D. 6.4 Hybridisierung von pGV 0201 mit klonierter pAT 18-31 DNA

Zur endgültigen Klärung des Homologiebereichs von pGV 0201 und dem BamHI-2 oder BamHI-3 Fragment von pAT 18-31, wurde ^{32}P-markiertes pGV 0201 mit den Hybridplasmiden pIB 1 (BamHI-2) und pIB 2 (BamHI-3) hybridisiert.

Das Autoradiogramm in Abb. 22 zeigt lediglich Hybridisierung von ^{32}P-pGV 0201 mit dem Fragment BamHI-2 aus pIB 1; das Fragment BamHI-3 aus pIB 2 ist nicht homolog mit pGV 0201.

Abb. 23 zeigt die Restriktionskarte von pAT 18-31 nach S. Kutz (1984). Das mit pGV 0201 homologe BamHI-2 Fragment ist durch Punktierung hervorgehoben.

Die BamHI Fragmente 7 und 8 von pAT 18-31 grenzen direkt an das BamHI-2 Fragment an. In diesen Fragmenten konnte jedoch keine Homologie mehr mit pGV 0201 nachgewiesen werden.

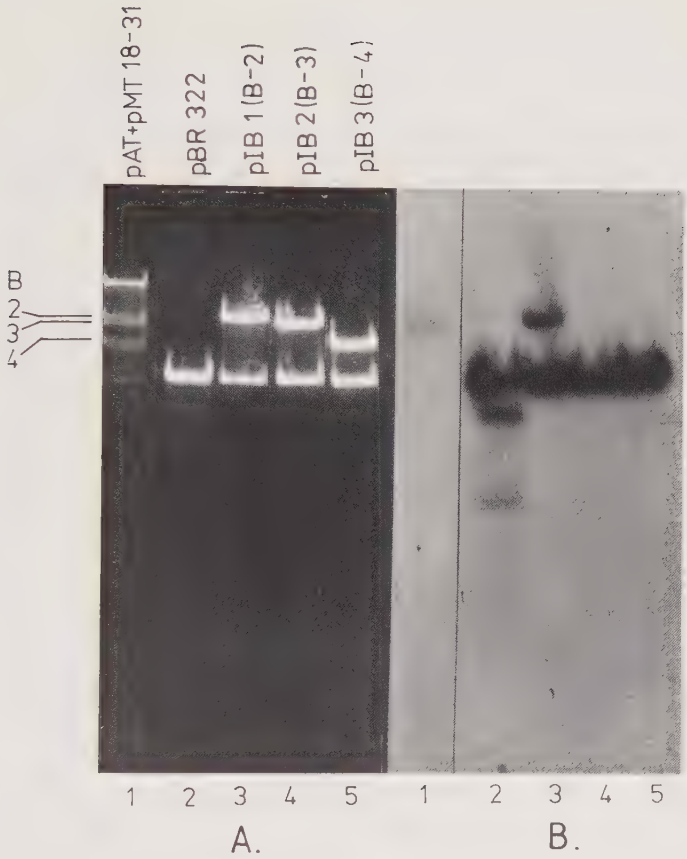


Abb. 22 Hybridisierung mit pGV 0201

A. Agarosegelelektrophorese von BamHI verdauter pAT+pMT 18-31 (Bahn 1), pBR 322 (Bahn 2), pIB 1 (Bahn 3), pIB 2 (Bahn 4) und pIB 3 (Bahn 5) DNA.

B. Autoradiogramm nach Hybridisierung mit ^{32}P-markierter pGV 0201 DNA.

Hybridisierungsbedingungen: 40% Formamid, 44°C.

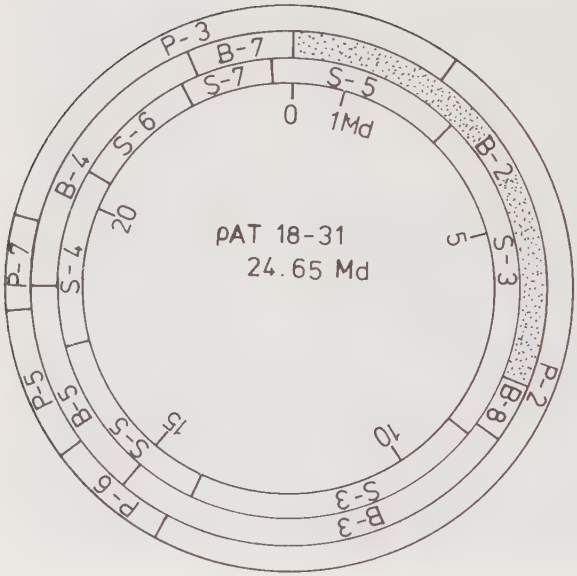


Abb. 23 PstI-, BamHI- und SmaI-Restriktionskarte von pAT 18-31 nach Kutz (1984)
P=PstI, B=BamHI, S=SmaI
Punktierung des pAT 18-31/BamHI-2 Fragments weist auf den Homologiebereich mit pGV 0201 hin.

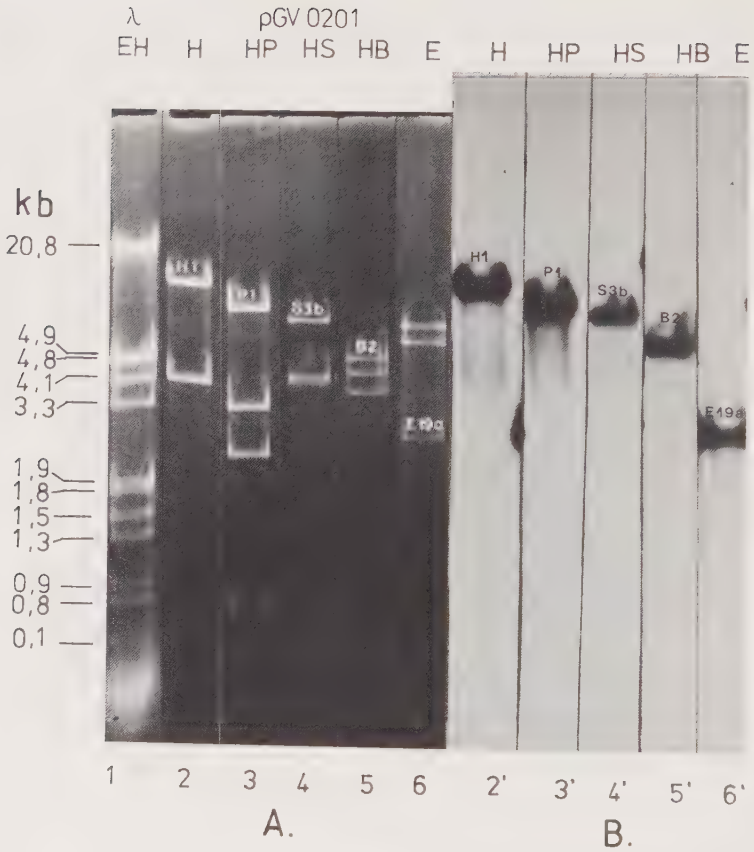
D. 6.5 Feinlokalisierung des Homologiebereichs zwischen pGV 0202/HindIII-1 und dem BamHI-2 Fragment aus pIB 1

PGV 0201 trägt das 12,6 kb große HindIII-1 Fragment der T-DNA von pTiACH 5.
Zur genaueren Eingrenzung des Homologiebereichs zwischen dem pGV 0201/HindIII-1 Fragment und dem BamHI-2 Fragment aus pIB 1 wurde pGV 0201 mit verschiedenen Restriktionsenzymen einfach oder doppelt verdaut, auf NC-Filter transferiert und mit präparativ isoliertem (C.2.8) ^{32}P-markiertem BamHI-2 Fragment aus pIB 1 hybridisiert (Abb. 24 A und B).

BamHI-2 aus pIB 1 hybridisiert mit den Fragmenten HindIII-1 (12,6 kb), PstI-1 (9,2 kb), SmaI-3b (8 kb), BamHI-2 (5,6 kb) und EcoRI 19a (2,9 kb) von pGV 0201.
BamHI-2 aus pIB 1 hybridisiert nicht mit den Fragmenten EcoRI-7 (6,1 kb) und EcoRI-12 (3,1 kb) von pGV 0201.

Daraus ist zu schließen, daß sich der Homologiebereich auf das EcoRI-19a Fragment von pGV 0201 beschränkt - ein DNA-Stück von 2,9 kb.

Die Lage der erwähnten Fragmente von pGV 0201 ist der Abb. 24 C zu entnehmen.



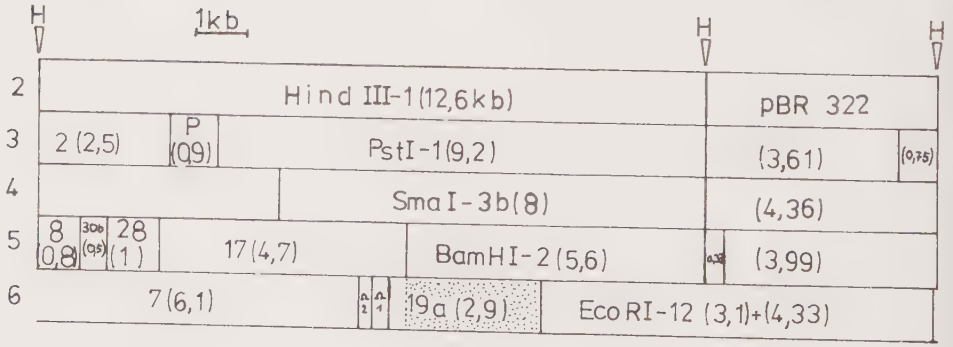


Abb. 24 A, B, C Legende siehe nächste Seite

Legende zu Abb. A, B und C

Hybridisierung von ^{32}P-markiertem, isolierten BamHI-2 Fragment aus pIB 1 mit pGV 0201

A. Agarosegelelektrophorese von HindIII- (Bahn 2), HindIII/PstI- (Bahn 3), HindIII/SmaI- (Bahn 4), HindIII/BamHI- (Bahn 5) und EcoRI- (Bahn 6) verdauter pGV 0201 DNA.

   In Bahn 1 sind die Fragmente EcoRI/HindIII verdauter λ DNA als Größenmarker aufgetrennt.
   H = HindIII, P = PstI, S = SmaI, B = BamHI, E = EcoRI

B. Autoradiogramm nach Hybridisierung mit ^{32}P-markierten BamHI-2 Fragment aus pIB 1
   Hybridisierungsbedingungen: 20% Formamid, 44°C

C. Restriktionskarte von pGV 0201 für die Enzyme HindIII (aus Bahn 2), HindIII/PstI (aus Bahn 3), HindIII/SmaI (aus Bahn 4), HindIII/BamHI (aus Bahn 5), und EcoRI (aus Bahn 6).
   Die Fragmentgrößen für pGV 0201 nach De Vos (1981), für pBR 322 nach Peden (1983)

Der kleinste homologe Bereich zwischen pGV 0201 und dem BamHI-2 Fragment aus pIB 1 ist punktiert.

D. 7 Octopin und Nopalin Nachweis

Den Nachweis von Octopin und Nopalin in Pflanzentumorgeweben kann man auf zwei verschiedenen Wegen führen:

a) als direkten Nachweis von Octopin oder Nopalin im Tumorgewebe
b) oder indirekt, durch Nachweis von Octopin-Dehydrogenase (ODH) oder Nopalin-Dehydrogenase (NDH) im Rohextrakt des Tumorgewebes.

Bevorzugt wurde die zweite Art des Nachweises der Opinsynthese. Diese Methode nach Otten et al. (1978) ist sehr empfindlich und erfordert nur eine geringe Menge an Tumorgewebe.

D. 7.1 Auflösungsgrenzen für Octopin und Nopalin

Um die Auflösungsgrenzen des Versuchs festzulegen, wurden zwischen 0,75 und 15 µg der Reinsubstanzen von Octopin und Nopalin elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Anfärben mit Phenanthrenchinon konnten 0,75 µg Octopin und Nopalin noch deutlich als helle Flecke identifiziert werden (Abb. 25).

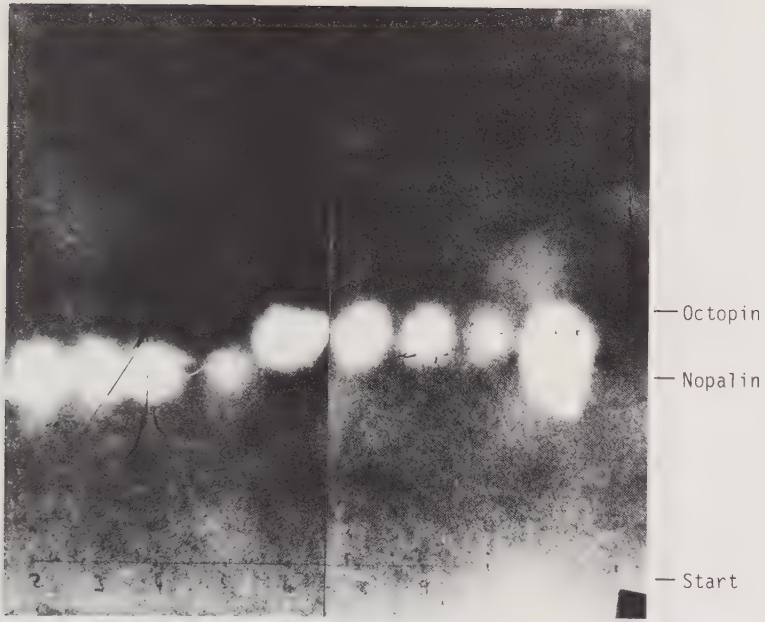


Abb. 25 Nachweisgrenzen von Octopin und Nopalin durch Papierelektrophorese

D. 7.2 Tumorbildung auf Kartoffelscheiben und Bryophyllum

Kartoffeltumore

Sterile Kartoffelscheiben wurden wie schon früher beschrieben (Bauer 1981) mit dem Agrobacterium Stamm 18-31 des Schemas beimpft.
Als positive Octopin- bzw. Nopalin-Kontrollen dienten Kartoffelscheiben beimpft mit A. tumefaciens C 58 (Nopalin) bzw. A. tumefaciens B_6S_3 (Octopin).
Als negative Kontrolle wurden unbeimpfte Kartoffelscheiben verwendet.

Während bei 18-31 schon nach 1 Woche die ersten Tumoren auf den Kartoffeln zu sehen waren, bildeten C 58 und B_6S_3 erst nach 12 Tagen die ersten sichtbaren Wucherungen.

Nach 6 Wochen waren deutliche Unterschiede im äußeren Erscheinungsbild der Tumoren von 18-31, C 58 und B_6S_3 festzustellen:
Bei A. tumefaciens C 58 hatten sich auf mehr als 60% der Kartoffelscheiben grüne, meist rauhe Wucherungen gebildet (Abb. 26).
A. tumefaciens B_6S_3 induzierte auf mehr als 70% der Kartoffeln grüne, größtenteils oberflächlich glatte Tumoren (Abb. 27).
Alle Tumoren von 18-31 waren farblos oder braun und wiesen eine rauhe zerklüftete Oberfläche wie die von B_6S_3 auf (Abb. 28).

Bryophyllumtumoren

Byrophyllum-Tumoren induziert durch A. tumefaciens B_6S_3 sowie 18-31 wurden von W. Heumann (Erlangen) und 3 Monate alte Bryophyllum-Tumoren hervorgerufen durch A. tumefaciens C 58 von H.-V. Tichy (Erlangen) zur Verfügung gestellt.

Abb. 26 Die Kartoffeltumoren von A. tumefaciens C 58 (Nopalin-Stamm) sind meist grün, die Oberflächenstruktur ist rauh. (Aufnahme Dr. Rösch).

Abb. 27 Die Kartoffeltumoren von A. tumefaciens B_6S_3 (Octopin-Stamm) sind überwiegend grün und haben eine glatte Oberfläche. (Aufnahme Dr. Rösch).

Abb. 28 Die Kartoffeltumoren von A. tumefaciens 18-31 sind ausschließlich farblos oder braun und zeigen eine rauhe Oberfläche. (Aufnahme Dr. Rösch)

D. 7.3 Octopin und Nopalin in Tumor-Rohextrakten

Zum direkten Nachweis von Octopin und Nopalin wurden jeweils 10 mg Tumorgewebe (10-60 Tage nach Infektion) aufgearbeitet. Untersucht wurden Tumoren hervorgerufen durch A. tumefaciens 18-31, A. tumefaciens C 58 (positive Nopalin-Kontrolle) und A. tumefaciens B_6S_3 (positive Octopin-Kontrolle). Nicht infiziertes Gewebe diente als Negativ-Kontrolle.

Nach elektrophoretischer Auftrennung von Rohextrakten aus 18-31 induzierten Kartoffel- oder Bryophyllumtumoren, konnte weder Octopin noch Nopalin nachgewiesen werden (keine Abb.). In Rohextrakten aus B_6S_3 Tumoren (positive Octopin-Kontrolle) wurde ebenfalls kein Octopin im direkten Nachweisverfahren gefunden (keine Abb.).
Dagegen war in Rohextrakten von Kartoffel- und Bryophyllumtumoren, induziert durch C 58 (positive Nopalin-Kontrolle), Nopalin in hoher Konzentration vorhanden (Abb. 29).

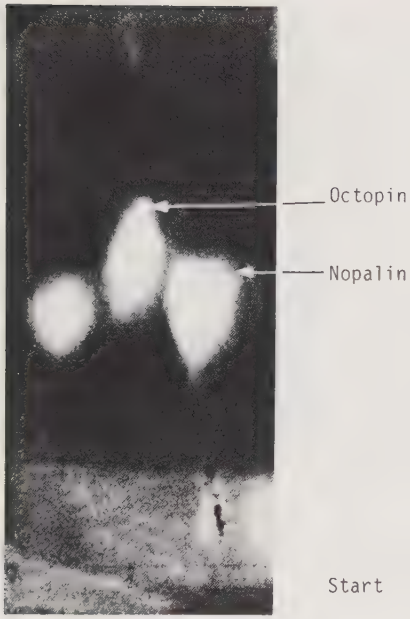


Abb. 29 Nopalin im Rohextrakt von Bryophyllumtumoren induziert durch A. tumefaciens C 58

Bahn 1: reines Nopalin (25 µg)
Bahn 2: reines Octopin (25 µg)
Bahn 3: Nopalin im C 58 Bryophyllumtumor-Rohextrakt

D. 7.4 ODH- und NDH-Aktivität in Tumor-Rohextrakten

Parallel zum direkten Opin Nachweis (vgl. D.7.3) wurde jeweils die ODH- bzw. NDH-Aktivität im Tumorrohextrakt getestet. Die Enzyme ODH und NDH sind nur im Tumorgewebe nachzuweisen. ODH synthetisiert Octopin nach Zugabe von Arginin und Pyruvat; NDH baut aus Arginin und α-Ketoglutarat Nopalin auf.
Beide Enzyme benötigen NADPH oder NADH als Cofaktoren.

In Rohlysaten von Kartoffel- und Bryophyllumtumoren, induziert durch 18-31 konnte keine ODH- und keine NDH-Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 29 und Abb. 30).
Die fluoreszierenden Flecken des Papierelektrophoretogramms von normalen Kartoffel- oder Bryophyllumgewebe nach dem ODH bzw. NDH Test (t = 1,5 h) wurden als unspezifische Negativkontrolle gewertet.
ODH-Aktivität führte bei der Positivkontrolle in Rohextrakten von B_6S_3 induzierten Kartoffeltumoren (Abb. 30, Bahn 4) und Bryophyllumtumoren (Abb. 31, Bahn 4 + 5) zur Bildung von Octopin in nachweisbaren Mengen.
Die ODH-Aktivität in den B_6S_3-Bryophyllumtumoren wurde nach Vergleich der Octopin-Flecken auf dem Papierelektrophoretogramm mit verschiedenen Octopin-Reinsubstanz-Konzentrationen auf 4,1 µM/h•g geschätzt ($\hat{=}$ 1 mg gebildetes Octopin pro Stunde und Gramm Tumorgewebe) (Abb. 30 und 31).

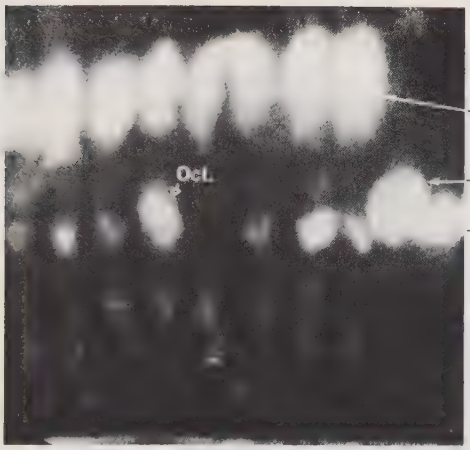


Abb. 30 ODH-Test mit Extrakten von Kartoffeltumoren, induziert durch A. tumefaciens B_6S_3, C 58 und 18-31

Bahn 1+2:	Kartoffelgewebe (Negativkontrolle)	t=1,5h
Bahn 3 :	Tumorextrakt von B_6S_3	t=0
Bahn 4 :	" " "	t=1,5h
Bahn 5 :	Tumorextrakt von 18-31	t=0
Bahn 6 :	" " "	t=1,5h
Bahn 7 :	Tumorextrakt von C 58	t=0
Bahn 8 :	" " "	t=1,5h
Bahn 9 :	reines Octopin (10 µg)	
Bahn 10 :	reines Nopalin (10 µg)	

t=0 : Probe am Anfang des ODH-Aktivitätstest vor der Inkubation

t=1,5: Probe nach 1,5 Stunden (h) Reaktionszeit

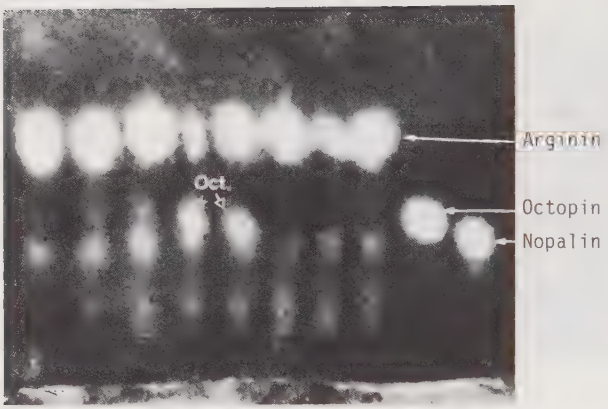


Abb. 31 ODH-Test mit Extrakten von Bryophyllumtumoren, induziert durch A. tumefaciens B_6S_3 und 18-31

Bahn 1	: Bryophyllumgewebe (Negativkontrolle)	t=0
Bahn 2	: "	t=1,5h
Bahn 3	: Tumorextrakt von B_6S_3	t=0
Bahn 4+5:	" " "	t=1,5h
Bahn 6	: Tumorextrakt von 18-31	t=0
Bahn 7+8:	" " "	t=1,5h
Bahn 9	: reines Octopin (5 µg)	
Bahn 10	: reines Nopalin (5 µg)	

t=0 : Probe am Anfang des ODH-Aktivitätstest vor der Inkubation

t=1,5: Probe nach 1,5 Stunden (h) Reaktionszeit

E. Diskussion

Das von Heumann et al. (1984) vorgestellte Genomumstrukturierungsschema der Rhizobiaceae umfaßt 5 verschiedene, ineinander durch UV-Bestrahlung mit nachfolgender Stressbehandlung umwandelbare Bakterienklassen mit unterschiedlichen phänotypischen und genotypischen Eigenschaften.

In Klasse I dieses Schemas sind onkogene Agrobacterium Stämme und nicht onkogene Minimal-Typ Stämme zusammengefaßt (vgl. S. 4).

In der vorliegenden Arbeit sollten die Stämme der Klasse I vergleichend untersucht, näher charakterisiert und mit A. tumefaciens Standard Stämmen aus der Phabagen Sammlung verglichen werden.

Außerdem sollte untersucht werden, ob Homologie zwischen der DNA der Stämme des Schemas mit T-DNA von Octopin- und Nopalin Agrobacterium Stämmen besteht, und ob Pflanzentumoren, induziert durch die Agrobacterium Stämme des Schemas Octopin oder Nopalin produzieren.

Homologiebereiche zwischen T-DNA aus A. tumefaciens ACH 5 und DNA aus Agrobacterium Stämmen des Schemas waren näher zu charakterisieren und einzugrenzen.

E. 1. Die Agrobacterium und Min-Typ Stämme des Schemas

a) Agrobacterium Stämme (Ib)

Die Agrobacterium Stämme des Schemas kann man in einer Gruppe mit völlig gleichen physikalischen Daten und genetischen Eigenschaften zusammenfassen.

Alle untersuchten Agrobacterium Stämme des Schemas beinhalten 5 Plasmide von 23 - 300 Md Größe (Bauer 1981, Heumann et al. 1984).
Die Restriktionsmuster der Gesamt-DNA war in allen untersuchten Stämmen gleich welcher Herkunft identisch, unabhängig vom verwendeten Restriktionsenzym.

b) Min-Typ Stämme (Ia)

Die Min-Typ Stämme sind hinsichtlich ihrer Plasmidausstattung und ihrer Restriktionsmuster der Gesamt-DNA im Vergleich zu den Agrobacterium Stämmen (Ib) uneinheitlicher.

Man kann die Min-Typ Stämme in 2 Gruppen, Iaα und Iaß, einteilen:
In der Min-Typ Gruppe Iaα wurden 1-3 Plasmide gefunden. Ein ca. 300 Md großes Plasmid kommt in allen untersuchten Min-Typ Stämmen der Gruppe Iaα vor, ein ca. 24 Md großes Plasmid (pMT) fand sich gleichzeitig nur in einem Teil dieser Stämme.

Über die genetische Information und die Herkunft der 300 und 24 Md Plasmide ist bisher noch nichts bekannt.

Hybridisierungsversuche mit dem 24 Md Plasmid pMT 31-15 als radioaktive Probe zeigte Homologie mit allen anderen untersuchten 24 Md Plasmide der Stämme der Min-Typ Gruppe Iaα und der Agrobacterium Stämme (Ib) des Schemas.

Die Min-Typ Stämme der Gruppe Iaα haben neben der Plasmidausstattung, der identischen DNA-Dichte von 1,717 g/cm³ der chromosomalen DNA und 1,716 g/cm³ der pMT, der Sensitivität für den Bacteriophagen Φ 18 (Winkler 1984) noch ein nahezu identisches XhoI Restriktionsmuster der Gesamt-DNA (Bauer 1981, siehe auch Abb. 4) mit den Agrobacterium Stämmen (Ib) des Schemas gemeinsam.

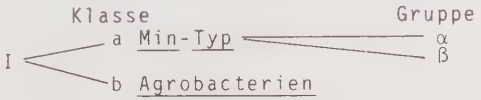
Unterschiede zwischen den Min-Typ Stämmen Iaα und den Agrobacterium Stämmen (Ib) des Schemas bestehen in der Kolonie- und Zell-Morphologie, der Generationszeit, der Onkogenität, der Sensitivität für Φ 31 (Bauer 1981, Heumann et al. 1984) und nach neueren Erkenntnissen von U. Sievert auch im Vorkommen von IS -Elementen: ISR 4 und ISR 5 sind in den Agrobacterien, nicht aber in den Min-Typ Stämmen Iaα zu finden (Sievert 1985).

Die Wahrscheinlichkeit, daß die Min-Typ Stämme Iaα aus Agrobacterium Stämmen (Ib) ohne Ti-Plasmid und kryptischem Plasmid (Doppelbande 140/126 Md) und ohne pAT bestehen könnten wurde erörtert (Bauer 1981, Heumann et al. 1984). Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen ebenfalls darauf hin, daß die Min-Typen Iaα direkt aus den Agrobacterium Stämmen des Schemas durch stressbedingten Plasmid-Verlust entstehen können.

Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen der Min-Typ Gruppe Iaα und den Agrobacterium (Ib) des Schemas sind in der Abb. 31 zusammengefaßt.

In der Min-Typ Gruppe Iaß kommen zwei Plasmide größer als 100 Md vor. Über die genetische Information dieser Plasmide ist allerdings noch nichts bekannt.
Plasmidausstattung und Restriktionsmuster der Gesamt-DNA vom Min-Typ Iaß unterscheidet sich deutlich vom Min-Typ Iaα. ISR 5 aus 31-35 (Min-Typ Iaß) ist nicht in Min-Typ Iaα, dagegen in mehreren Kopien im Agrobacterium Stamm 18-31 zu finden (Sievert 1985).
Sievert (1985) konnte aufgrund von Hybridisierungsversuchen zeigen, daß die Gesamt-DNA der Min-Typ Gruppen Iaα und Iaß Homologie aufweist.

Nach der vergleichenden Untersuchung der Stämme der Klasse I (vgl. Abb. 1) erschien mir folgende Unterteilung dieser Klasse als nützlich und sinnvoll:



	DNA-Dichte (g/cm^3)		Plasmide	Φ 18	Φ 31	Morphol.	Genzeit	Onkogen.	ISR 4* ISR 5*
	chrom.	Plasmid							
Agrob. (Ib)	1,717	1,717	p 300 Md	lys +	lys -	rauhe	$2\frac{1}{2}$ -3 h	onc+	+
			p 140 Md			Kolonien			
		1,716	p 126 Md			auf			
		(pMT)	pMT(24 Md)			Mannitol;			
		1,714				Stäbchen,			
		(pAT)	pAT(23 Md)			Bacteroide			
Min-Typ Iaα	1,717	1,717	p 300 Md	lys +	lys +	mucös	1 - $1\frac{1}{2}$ h	onc-	-
						auf			
		1,716				Mannitol;			
		(pMT)	pMT(24 Md)			Stäbchen			

Abb. 32 Übersicht: Gemeinsamkeiten und Unterschiede von Agrobacterium (Ib) und Min-Typ (Iaα).

* Sievert 1985, persönliche Mitteilung
lys + : Lyse
lys - : keine Lyse
onc + : onkogen
onc - : nicht onkogen

E. 2 Vergleich der Agrobacterium Stämme des Schemas mit Agrobacterium Stämmen aus der Phabagen Sammlung (PC)

Die Restriktionsmuster der Gesamt-DNA aller untersuchten Agrobacterium Stämme des Schemas sind identisch- unabhängig vom verwendeten Restriktionsenzym.

Verglichen mit einigen Octopin Agrobacterium Stämmen aus der PC zeigen die Agrobacterien des Schemas deutliche Unterschiede im Restriktionsmuster der Gesamt-DNA.

Die Virulenz der Agrobacterium Stämme des Schemas ist wesentlich höher, als die der Standard Agrobacterien. Während erstere, auf Kartoffelscheiben geimpft, bereits nach 3-5 Tagen sichtbare Tumoren bilden, zeigen sich die Tumoren der Standardstämme unter gleichen Bedingungen erst nach 10-12 Tagen.
Wird die DNA von Schema-Agrobacterien hybridisiert mit T-DNA Proben eines Gemischs aus pGV 0201 + pGV 0153, so hybridisieren einheitlich bei den Schema-Stämmen 3 DNA Fragmente sehr stark, 3 weitere schwächer, während von Standard Agrobacterium C 58 nur ein Fragment stark, ein kleineres schwach hybridisiert (De Bruijn 1984). Über diese unterschiedliche Verteilung der T-DNA in Schema-Stämmen verglichen mit der in Standardstämmen gibt es leider noch keine weiteren Kenntnisse.

Die Untersuchung der Plasmide in Rohlysaten von PC Agrobacterien und den Agrobacterium Stämmen des Schemas ergab ebenfalls Unterschiede in Anzahl und Größe der vorhandenen Plasmide. Während bei den Schema-Agrobacterien immer 5 Plasmide mit ca. 300, 140, 126, 24 und 23 Md vorkommen, sind in den PC Agrobacterien höchstens 3 Plasmide nachzuweisen, die alle größer als 100 Md sind.
Kleine Plasmide von ca. 20 Md konnten in keinem der untersuchten PC Agrobacterien gefunden werden.

Sind kleine Plasmide mit ca. 20 Md typisch für die Agrobacterium Stämme des Schemas?

Currier und Nester (1976) konnten in den A. tumefaciens Stämmen AT-1 und AT-4, die von Lippincott et al. (1973) beschrieben wurden, je zwei 25 Md große Plasmide nachweisen, neben zwei großen Plasmiden von ca. 150 Md (Guyon et al. 1980). Über die genetische Information dieser 25 Md Plasmide von AT-1 und AT-4 (die weder Octopin noch Nopalin, jedoch Agropin als C+N-Quelle nutzen können) ist allerdings keine weitere Information verfügbar.

Es wäre interessant A. tum. AT-1 und AT-4 mit den Agrobacterium Stämmen des Schemas zu vergleichen. Im Besonderen wäre eine Homologie-Untersuchung zwischen den kleinen 25 Md Plasmiden dieser Stämme mit pAT+pMT der Agrobacterium Stämme des Schemas von Interesse.

Der A. tum. Stamm Bo542 (Petit et al. 1978) enthält 2 Plasmide mit ca. 150 Md (pTiBo542 und pkryptisch) und 2 Plasmide mit ca. 25 Md.
Guyon et al. (1980) führte einen konjugativen Ti-Plasmid-Transfer mit diesem Agropin-Stamm A. tum. Bo542 als Donor und dem plasmidfreien A. tum. C58CI als Rezipienten durch.

Die Transkonjuganten enthielten jeweils pTiBo542 sowie eines der beiden 25 Md Plasmide. Da durch Agropin der Ti-Plasmid-Transfer nicht effektiv induziert wird, könnte eines der kleinen Plasmide den konjugativen Transfer des Agropin Ti-Plasmids mobilisieren (Guyon et al. 1980).

Plasmid-Transferversuche mit Agrobacterium Stämmen des Schemas könnten Aufschluß geben:

a) ob pAT oder pMT zusammen mit dem Ti-Plasmid übertragen wird
b) ob pAT oder pMT mobilisierende Funktionen tragen?

E. 3. Hybridisierungsversuche mit T-DNA

Aufgabe dieser Arbeit war es, die Kenntnisse über die genetische Information der Plasmide von Agrobacterium Stämmen des Schemas zu erweitern und zu präzisieren.
Vor allem sollte untersucht werden:

- ob die hoch virulenten Agrobacterium Stämme Homologie mit der "core T-DNA" von Octopin- und Nopalin Ti-Plasmiden zeigen?
- wo diese homologen Bereiche zu finden sind
- und ob die Onkogenitätsgene in anderen Klassen des Genomumstrukturierungsschemas der Rhizobiaceen nachzuweisen sind?

Octopin und Nopalin Ti-Plasmide von A. tumefaciens Stämmen haben im Bereich der T-DNA eine homologe Region (Engler et al. 1981), die "core T-DNA".
In dieser Arbeit wurde zur Klärung der oben aufgeführten Fragen die klonierte core T-DNA des Ti-Plasmids von A. tumefaciens ACH 5 (pTi ACH 5) als radioaktiv markierte Probe zu Homologieuntersuchungen verwendet (Abb. 33).
Die T-Region von pTiACH 5 (Abb. 33) kann in T_L- und T_R-Region eingeteilt werden (De Beuckeleer et al. 1981). Die core T-DNA liegt im Bereich der Octopin-T_L-DNA.

Die T_L-DNA wird von 25 bp "DR" begrenzt (Holsters et al. 1981). Im Bereich der T_L-DNA sind 8 Codierungseinheiten (Transkript 1, 2, 3, 4, 5, 6a, 6b und 7), die die genetische Information für die Tumormorphologie und die Octopin Produktion (ocs-Gen) tragen (Willmitzer et al. 1983).

Das als radioaktive Probe hauptsächlich verwendete, klonierte HindIII-1 Fragment von pTi ACH 5 überlappt den rechten Bereich der T_L-DNA und reicht bis in die T_R-DNA hinein.

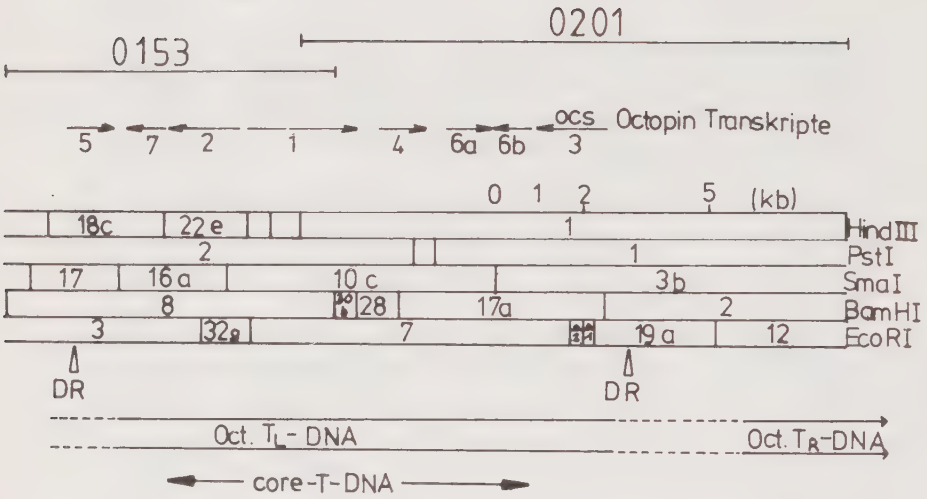


Abb. 33

Die T-Region des Octopin Plasmids pTiACH5

Die Restriktionskarte von pTiACH5 für die Enzyme HindIII, SmaI, BamHI und EcoRI ist entnommen aus De Vos et al. 1981; die Schnittstellen für PstI aus Willmitzer et al. 1982.

Die Lokalisation der 25 bp direct repeats (siehe Pfeil, DR) sind eingetragen nach Holsters et al. 1983.

Die Ausdehnung von Octopin T_L- und T_R-DNA stammen aus De Beuckeleer et al. 1981. Die punktierten Linien weisen auf unterschiedliche Endpunkte der T-DNA in verschiedenen Tumorlinien hin.

Position, Größe und Polarität der Octopin Transkripte sowie die Lage der "core-T-DNA" sind entnommen aus Willmitzer et al. 1983 (ocs = Octopinsynthase).

Die Lage der in dieser Arbeit als radioaktive Proben verwendeten Hybridplasmide pGV0201 (pTiACH5/HindIII-1) und pGV0153 (pTiACH5/BamHI-8) (De Vos et al. 1981) sind oberhalb der Restriktionskarte eingetragen.

Über die genetische Information der T_R-DNA, die nur in einigen Tumoren nachgewiesen werden konnte (De Beuckeleer et al. 1981), ist bei pTi ACH 5 noch nichts bekannt.
Bei dem mit pTiACH5 größtenteils homologenen Octopin Plasmid $pTiB_6S_3Tra^c$ wurden im Bereich der T_R-DNA 3 Gene nachgewiesen, die für den Biosyntheseweg von Agropin codieren (Ellis et al. 1984).

Durch Hybridisierungsversuche unter stringenten Bedingungen zwischen T-DNA von pTiACH 5 kloniert in pBR322 (Klone pGV0201 und pGV0153) und der Gesamt-DNA verschiedener Klassen konnte Homologie nur mit den Agrobacterium Stämmen des Schemas nachgewiesen werden.
Außerdem gibt es einen Hinweis auf Homologie zwischen pGV0201 und Plasmid DNA aus Min-Typ Stämmen der Gruppe Iaß. Die homologe Region wurde nicht näher untersucht.

Einige bei Hybridisierung mit DNA der Klasse III (nif-Typ) auf dem Autoradiogramm gefundenen Banden konnten auf Homologie mit dem Vektor pBR 322 der klonierten HindIII-1 und BamHI-8 Fragmente von pTiACH 5 zurückgeführt werden.
Prakash und Schilperoort (1982) beschreiben Homologie zwischen Nif-Plasmiden schnellwachsender Rhizobien und A. tumefaciens Ti-Plasmiden, konnten aber auf der T-DNA ebenfalls keine homologen Sequenzen mit Nif-Plasmiden finden.

Hadley und Szalay (1982) fanden homologe Bereiche zwischen dem T-DNA Fragment HindIII-1 von pTiACH5 und DNA aus schnell und langsam wachsenden Rhizobium Wildtyp Stämmen.
In dieser Arbeit wurde Gesamt-DNA aus verschiedenen Rhizobium Wildtyp Stämmen der Klasse II hybridisiert mit pGV0201 (pTiACH5/HindIII-1) und pGV0153 (pTiACH5/BamHI-8). Homologie zur T-DNA konnte nicht gefunden werden. Dies ist wahrscheinlich auf die hier angewandte hohe Stringenz zurückzuführen.

In den Klassen IV und Vb wurde ebenfalls keine Homologie zur T-DNA gefunden.
Die Klasse Va wurde im Verlauf dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Aufgabe weiterer Arbeiten wäre die Hybridisierung von T-DNA oder subklonierter T-DNA-Fragmente unter weniger stringenten Bedingungen mit DNA aus den Klassen II - V des Schemas.

Lokalisierung des homologen Bereichs von DNA aus der Klasse I und T-DNA aus pTiACH 5:

Zur exakten Lokalisierung der homologen Region der T-DNA aus pTiACH 5 und DNA aus Agrobacterium Stämmen, Klasse Ib, wurde Plasmid-DNA aus Rohlysaten der Agrobacterium Stämme mit pGV0201 und pGV0153 (pTiACH5/HindIII-1 und pTiACH5/BamHI-8) hybridisiert.
Homologie konnte sowohl von pGV0201 als auch von pGV0153 mit der Doppelbande von p126+p140 der Agrobacterium Stämme des Schemas gefunden werden. Die Intensität der Hybridisierung war bei Verwendung von pGV0201 als radioaktive Probe größer. Zumindest eines der großen Plasmide (p126, p140) zeigt demnach Homologie mit T-DNA aus Agrobacterium Standard Stämmen.

pGV0201 hybridisierte außerdem mit den kleinen Agrobacterium spezifischen Plasmiden (pAT) von ca. 23 Md. Der homologe Bereich konnte im klonierten BamHI-2 Fragment von pAT 18-31 lokalisiert werden.
Nach Hybridisierung des BamHI-2 Fragments aus pAT 18-31 mit einfach und doppelt verdauter pGV0201 DNA, konnte die homologe Region auf das Subfragment EcoRI-19a von pGV0201 eingegrenzt werden.

Nach Barker et al. (1983) liegt das EcoRI-19a Fragment in einer GC-reichen Region (T_C-DNA, c=center) zwischen T_L- und T_R-DNA (L=Links, R=Rechts). Während T_L- und T_R-DNA eukaryontischer Herkunft sind, hat die T_C-DNA prokaryontischen Ursprung (Barker et al. 1983, Machida 1984).

Die T_C-DNA wird von direkt repetitiven Sequenzen mit 24 bp Länge begrenzt (T-DNA Border Sequenzen), die sekundäre Strukturen bilden können und auf Erkennungs- und Regulationsstellen in der DNA hinweisen.

Machida (1984) fand im Bereich der T_C-DNA ein IS-Element (IS66) prokaryontischen Ursprungs mit 2,5 kb Länge, das von "inverted repeats" begrenzt wird.
Dieses IS-Element scheint aus dem Chromosom (2 Kopien im Chromosom) ins Ti-Plasmid gesprungen zu sein und teilt die T-Region in T_L- und T_R-DNA (Machida 1984).
IS66 aus pTiA66 ist nur teilweise homolog mit der T_C-DNA anderer Octopin-Ti-Plasmide, was das Ergebnis von IS-bedingter DNA-Umstrukturierung sein dürfte (Iida et al. 1983).

Welche Bedeutung haben die oben genannten Untersuchungen für die hier vorliegenden Ergebnisse der Homologie zwischen pAT 18-31/BamHI-2 und pTiACH5/EcoRI-19a?

Da das mit pAT 18-31/BamHI-2 Fragment homologe EcoRI-19a Fragment von pTiACH5 im Bereich der T_C-DNA lokalisiert ist (Barker et al. 1983), ist die Möglichkeit zu erörtern und in späteren Arbeiten nachzuprüfen, ob diese homologe pAT 18-31 Region eine IS-Struktur zeigt und ob diese Struktur im Chromosom und auf dem Ti-Plasmid der Agrobacterium Stämme des Schemas zu finden ist.

Der Nachweis der Homologie eines Fragments aus einem kleinen Plasmid der Agrobacterium Stämme mit einem T_C-DNA Fragment

bakteriellen Ursprungs, bei dem "direct repeats", "inverted repeats" und ein IS-Element gefunden wurden, unterstützt die Vorstellung, daß diese Strukturen bei der von W. Heumann postulierten Genomumstrukturierung der Rhizobiaceen beteiligt sind (Heumann et al. 1984, Rüger 1984).

In welche Kategorie lassen sich die Ti-Plasmide der Agrobacterium Stämme des Schemas einteilen?

Die Ti-Plasmide von A. tumefaciens Stämmen werden nach ihrer Fähigkeit die Synthese von Opinen in Pflanzentumoren zu induzieren und diese Opine zu dissimilieren in Octopin, Nopalin und O-Typ oder Agropin-Typ Ti-Plasmide eingeteilt. O-Typ oder Agropin Ti-Plasmide, die große Homologie mit Octopin Ti-Plasmiden zeigen, sind nach Meinung von Guyon et al. (1980) evolutionäre Vorläufer der Octopin Ti-Plasmide.

In Kartoffel- und Bryophyllumtumoren induziert durch Agrobacterium Schema-Stamm 18-31 konnte weder Octopin noch Nopalin gefunden werden. Die Ti-Plasmide der Agrobacterium Stämme des Schemas scheinen daher zu der Rubrik der O-Typ Ti-Plasmide zu gehören. O-Typ Ti-Plasmide codieren für Synthese und Abbau von Agropin, Mannopin und Agrocinopin C und D (Petit et al. 1983). Aufgabe weiterer Untersuchungen wäre die Absicherung der Zugehörigkeit der Ti-Plasmide der Agrobacterium Stämme des Schemas zu der Agropin-Familie.

Anhang I: Zusammenstellung der verwendeten Abkürzungen

Ap	:	Ampicillin
ATP	:	Adenosintriphosphat
A. tum.	:	*Agrobacterium tumefaciens*
aux.	:	auxotroph
B	:	*Bam*HI
BAP	:	Bakterielle Alkalische Phosphatase
bp	:	Basenpaare
BPB	:	Bromphenolblau
car-Typ	:	*Carotinoid*-Typ
core-T-DNA	:	homologe T-DNA Region in Octopin und Nopalin Ti-Plasmiden
CsCl	:	Cäsiumchlorid
CT-DNA	:	Kalbsthymus-DNA
DNA	:	Desoxyribonucleinsäure
DNAP	:	DNA-Polymerase
DNase	:	Desoxyribonuclease
DR	:	direct repeat
DTT	:	Dithiotreit
E	:	*Eco*RI
E. coli	:	*Escherichia coli*
EDTA	:	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	:	Ethidiumbromid
Genzeit	:	Generationszeit
H	:	*Hind*III
IS	:	Insertions-Element
kb	:	Kilobasenpaare (10^3 bp)
Md	:	Megadalton (10^6 dalton)
Min-Typ	:	*Minimal*-Typ
NAD	:	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NC-Filter	:	Nitrocellulose-Filter
nif	:	nitrogen fixation
Nop.	:	Nopalin
Oct.	:	Octopin
PC	:	Phabagen Collection (Utrecht, NL)

P	:	PstI
R. jap.	:	Rhizobium japonicum
R. leg.	:	Rhizobium leguminosarum
R. mel.	:	Rhizobium meliloti
R. trif.	:	Rhizobium trifolii
RNase	:	Ribonuclease
rpm	:	rounds per minute
SDS	:	Sodiumdodecylsulfate
Sm	:	Streptomycin
S	:	SmaI
Tc	:	Tetrazyklin
T-DNA	:	Ti-Plasmid Region, die in Pflanzen transferiert wird
Ti-Plasmid	:	Tumor induzierendes Plasmid von A. tum.
T_C-DNA	:	zentrale T-DNA
T_L-DNA	:	linke Seite der T-DNA
T_R-DNA	:	rechte Seite der T-DNA
Tris	:	Trishydroxymethylaminomethan
UV	:	Ultraviolettes Licht
V	:	Volt
Vol.	:	Volumen
v/v	:	Volumenprozent
w/v	:	Gewichtsprozent

Anhang II: Literaturverzeichnis

Bauer, Irmtraud
Genomumstrukturierung bei Rhizobiaceae
Diplomarbeit, Erlangen (1981)

Barker, R.F., K.B. Idler, D.V. Thompson and J.D. Kemp
Nucleotide sequence of the T-DNA region from the Agrobacterium tumefaciens octopine Ti plasmid pTi15955
Plant Molecular Biology 2, 335-350 (1983)

Bazaral, M. and D.R. Helinski
Circular DNA Forms of Colicinogenic Factors E_1, E_2 and E_3 from E. coli
J. of Molec. Biol. 36, 185-194 (1968)

Birnboim, H.C. and J. Doly
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA
Nucleic Acid Research 7, 1513-1523 (1979)

Bolivar, F., R.L. Rodriguez, P.J. Greeve, M.C. Betlach, H.L. Heyneker, H.W. Boyer, J. Crosa, S. Falkow
Construction and Charakterization of New Cloning Vehicles II. A. Multipurpose Molecular Cloning System
Gene 2, 95-113 (1977)

Burkardt, B. and H.J. Burkardt
Visualization and exact molecular weight determination of Rhizobium meliloti megaplasmid
J. Mol. Biol. 175, 213-218 (1984)

Burkardt, H. and R. Lurz
Advanced Molecular Genetics (Pühler, Trumis)
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg (1984)

Burkardt, H.J., G. Riess and A. Pühler
Relationship of Group P_1 Plasmids revealed by heteroduplex experiments: RP1, RP4, R68 and RK2 are identical
J. Gen. Microbiol. 114, 341-348 (1979)

Currier, T.C. and E.W. Nester
Evidence for Diverse Types of Large Plasmids in Tumor-Inducing Strains of Agrobacterium
J. Bacteriol. 126, 157-165 (1976)

Dagert, M. and S.D. Ehrlich
Prolonged incubation in Calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells
Cell 6, 23-28 (1979)

De Beuckeleer, M., M. Lemmers, G. De Vos, L. Willmitzer, M. Van Montagu and J. Schell
Further Insight on the Transferred-DNA of Octopine Crown Gall
Mol. Gen. Genet. 183, 283-288 (1981)

De Bruijn, F.
persönliche Mitteilung (1984)

Denhardt, D.
Biochem. Biophys. Res. Commun 23, 641-652 (1966)

De Vos, G., M. De Beuckeleer, M. Van Montagu and J. Schell
Restriction Endonuclease Mapping of the Octopine-Inducing Plasmid pTiACH5 of Agrobacterium tumefaciens
Plasmid 6, 249-253 (1981)

Eckhardt, Thomas
A Rapid Method for the Identification of Plasmid Desoxyribonucleic Acid in Bacteria
Plasmid 1, 584-588 (1978)

Ellis, J.G., M.H. Ryder and M.E. Tate
Agrobacterium tumefaciens T_R-DNA encodes a pathway for agropine biosynthesis
Mol. Gen. Genet. 195, 466-473 (1984)

Engler, G., A. Depicker, R. Maenhaut, R. Villarroel, M. Van Montagu and J. Schell
Physical Mapping of DNA Base Sequence Homologies between an Octopin and a Nopalin Ti Plasmid of Agrobacterium tumefaciens
J. Mol. Biol. 152, 183-208 (1981)

Franke, Petra
Die Charakterisierung des rot pigmentierten Rhizobiumstammes CB 376 durch bakteriologische und pflanzensymbiotische Merkmale
Diplomarbeit, Erlangen (1984)

Genetello, C., N. Van Larebeke, M. Holsters, A. Depicker, M. Van Montagu and J. Schell
Ti-Plasmids of Agrobacterium as Conjugative Plasmids
Nature 265, 561-563 (1977)

Guyon, Pierre
Agropin in "Null-type" Crown Gall Tumors: Evidence for Generality of the Opine Concept
Proc. Natl. Acad. Soc. 77, 2693-2697 (1980)

Hadley, R.G. and A.A. Szalay
DNA Sequences Homologous to the T DNA Region of Agrobacterium tumefaciens are Present in Diverse Rhizobium Species
Mol. Gen. Genet. 188, 361-369 (1982)

Heumann, Wolfram
Biologisches Zentralblatt Band 81, 341-354 (1962)

Heumann, W., A. Pühler und E. Wagner
The Two Transfer Regions of the Rhizobium luoini Conjugation
I. Fertility Factor Elimination and One Way Transfer
Mol. Gen. Genet. 113, 308-315 (1971)

Heumann, Wolfram
The two Transfer Regions of the Rhizobium lupini Conjugation
Genetic Characterizations of the Transferred Chromosomal Segments
Mol. Gen. Genet. 126, 267-274 (1973)

Heumann, Wolfram
Rhizobium lupini Genetics
Current Topics in Microbiology and Immunology
Springer, Berlin-Heidelberg-New York, Vol. 88, 1-23 (1979)

Heumann, W., B. Merkt, A. Rösch. R. Springer, B. Rüger, D. Horn, I. Bauer, K. Winkler and E. Wagner
Genome Rearrangement of the Rhizobiaceae
Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction
(ed. by A. Pühler), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg (1983)

Heumann, Wolfram, A. Rösch, R. Springer, E. Wagner and K.P. Winkler
In Rhizobiaceae five different species are produced by rearrangement of one genome, induced by DNA-damaging agents
Mol. Gen. Genet. 197 (3), 425ff (1984)

Holsters, M., B. Silva, C. Genetello, G. Engler, F. Van Vliet, M. De Block, R. Villarroel, M. Van Montagu and J. Schell
Spontaneous Formation of Cointegrates of the Oncogenic Ti-Plasmid and the Wide-Host-Range P-Plasmid RP4
Plasmid 1, 456-467 (1978)

Holsters, M., R. Villaroel, J. Seurinck, H. De Greve, M. Van Montagu and J. Schell
Mol. Gen. Genet. 190, 35-41 (1983)

Horn, Dagmar
Identifizierung und Charakterisierung von Plasmiden aus WT Stämmen von Rhizobium meliloti
Diplomarbeit, Erlangen (1981)

Horn, Dagmar
Institut für Mikrobiologie, Erlangen
persönliche Mitteilung (1983)

Iida, S., J. Meyer and W. Arber
In Mobile Genetic Elements
ed. Shapiro, J.A. Academic, New York, pp 159-221 (1983)

Kleinig, H., W. Heumann, W. Meister and G. Englert
Carotenoids of Rhizobia
I. New Carotenoids from Rhizobium lupini
Helv. Chim. Acta 60, 254-258 (1977)

Kleinig, H., R. Schmitt, W. Meister, G. Englert and H. Thommen
New C_{30}-Carotenoic Acid Glucosyl Esters from Pseudomonas rhodos
Z. Naturforschung 34c, 181-185 (1979)

Kleinschmidt, A.K. and R.K. Zahn
Über Desoxyribonucleinsäure-Moleküle in Protein-Mischfilmen
Z. Naturforsch. 14b, 770-779 (1959)

Kutz, Susanne
Physikalische Kartierung der Kleinen Plasmide pAT und pMT aus Agrobacterium tumefaciens 18-31
Diplomarbeit, Erlangen (1984)

Lippincott, J.A., R. Beiderbeck and B.B. Lippincott
Utilization of Octopine and Nopaline by Agrobacterium
J. Bacteriol. 116, 378-383 (1973)

Little, J.W. and D.W. Mount
The SOS Regulatory System of Escherichia coli
Cell 29, 11-22 (1982)

Machida, Y., M. Sakurai, S. Kiyokawa, A. Ubasawa, Y. Suzuki and J.E. Ikeda
Nucleotide sequence of the insertion sequence found in the T-DNA region of mutant Ti plasmid pTiA66 and distribution of its homologues in octopine Ti plasmid
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 7495-7499 (1984)

Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook
Molecular Cloning, p. 170
Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982)

Norris, D.O.
A Red Strain of Rhizobium from Lotononis bainesii
Baker Aust. J. Agr. Res. 9, 629-632 (1958)

Otten, L.A.B.M. and R.A. Schilperoort
A Rapid Micro Scale Methode for the Detestion of Lysopine and Nopaline Dehydrogenase Activities
Biochim. et Biophys. Acta 527, 497-500 (1978)

Peden, K.W.C.
Gene 22, 277 (1983)

Petit, A., J. Tempé, A. Kerr, A. Holsters, M. Van Montagu and J. Schell
Nature 271, 570-572 (1978)

Petit et al.
MGG 190, 204-214 (1983)

Prakash, R.K. and R.A. Schilperoort
Relationship Between Nif Plasmids of Fast-Growing Rhizobium Species and Ti Plasmids of Agrobacterium tumefaciens
J. Bacteriol. 149, 1129-1134 (1982)

Priefer, U.B.
Das Insertionselement ISR 1 aus Rhizobium lupini und seine mutagene Aktivität im Resistenzplasmid RP4
Dissertation, Erlangen (1980)

Radloff, R., W. Bauer and J. Vinograd
A Dye-Buoyant-Density Method for the Detection and Isolation of Closed Circular Duplex DNA: The Closed Circular DNA in Hela Cells
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 57, 1515-1520 (1967)

Rigby, P.W.J., M. Dieckmann. C. Rhodes and P. Berg
Labeling Desoxyribonucleic Acid to High Specific Activity in Vitro by Nick translation with DNA Polymerase I
J. Mol. Biol. 113, 237-251 (1977)

Roberts, G.P. and W.J. Brill
Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation
Ann. Rev. Microbiol. 35, 207-235 (1981)

Rüger, Barbara
IS-Elemente und Genomumstrukturierung bei Rhizobiaceae
Dissertation, Erlangen (1984)

Schell, J., M. Van Montagu, M. De Beukeleer, M. De Block, A. Depicker, M. De Wilde, G. Engler, C. Genetello, J.P. Hernalsteens, M. Holsters. J. Seurinck, B. Silva, F. Van Vliet and R. Villarroel
Interactions and DNA transfer between Agrobacterium tumefaciens, the Ti-plasmid and the plant host
Proc. R. Soc. Lond. B. 204, 251-266 (1979)

Schillik, Dagmar
persönliche Mitteilung
Institut für Mikrobiologie, Erlangen (1983, 1984)

Scybalski, E.H. and W. Scybalski
Gene 7, 217 (1979)

Sievert, Ursula
persönliche Mitteilung
Institut für Mikrobiologie, Erlangen (1985)

Southern, E.M.
Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Elektrophoresis
J. Mol. Biol. 98, 503-517 (1975)

Southern, E.M.
Gelelektrophoresis of Restriction Fragments
in Methods in Enzymology (Wu, R., ed.) 68, 152-176, Academic Press, New York (1979)

Springer, R.
Institutsinternes Symposium
Institut für Mikrobiologie, Erlangen (1982)

Stolp
persönliche Mitteilung
Institut für Mikrobiologie, Bayreuth (1983)

Tautz, D. and M. Renz
An Optimized Freeze-Sqeeze Method for the Recovery of DNA Fragments from Agarose Gels
Analytical Biochemistry 132, 14-19 (1983)

Willmitzer, L., J. Sanchez-Serrano, E. Buschfeld and J. Schell
DNA from Agrobacterium rhizogenens is Transferred to and Expressed in Axenic Hairy Root Tissues
Mol. Gen. Genet. 186, 16-22 (1982)

Willmitzer, L., R. Dhaese, P.H. Schreier, W. Schmalenbach, M. Van Montagu and J. Schell
Size, Location and Polarity of T-DNA-Encoded Transcripts in Nopaline Crown Gall Tumors; Common Transcripts in Octopine and Nopaline Tumors
Cell 32, 1045-1056 (1983)

Winkler, K.P.
Wirtskontrollierte Restriktions- und Modifikationssysteme bei Rhizobiaceen
Dissertation, Erlangen (1984)

Herrn Prof. Dr. W. Heumann danke ich für die Überlassung des Themas, für die stets freundliche, väterliche Unterstützung und für die vielen nützlichen Diskussionsbeiträge, die zur erfolgreichen Durchführung dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Herrn Dr. A. Rösch danke ich für die vielen organisatorischen Tips und Hilfestellungen.

Herrn Dr. R. Springer und Herrn Dr. P. Franke danke ich für die Unterstützung bei DNA-Dichtemessungen an der analytischen Ultrazentrifuge bzw. bei elektronenmikroskopischen Arbeiten.

Meiner stets hilfsbereiten Kollegin U. Sievert danke ich herzlich für die nette "Schreibtisch-Nachbarschaft" während unserer gemeinsamen Laborzeit.

Allen übrigen Mitgliedern des Instituts aus Labor, Fotolabor, Sekretariat, Küche und Werkstatt danke ich für die gute Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und Kameradschaft.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und den vielen lieben "Baby-Sittern" danken, die einen wesentlichen Teil zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

L E B E N S L A U F

Name:		Irmtraud Bauer, geb. Hammer
geboren am:		12.05.1956 in Breitenbrunn/Opf.
Vater:		Ulrich Hammer, geb. 28.05.27; gest. 15.10.73, Zimmermann
Mutter:		Barbara Hammer, geb. 21.08.26, Hausfrau
Familienstand:		verh. seit 12.09.80 mit Norbert Bauer, Arzt
Kinder:		Inka Barbara Bauer, geb. 07.06.84
Schulen:	1962-1968	Volksschule in Breitenbrunn/Opf.
	1968-1972	Realschule in Parsberg
	1972-1975	Hardenberg-Gymnasium in Fürth Abitur: 20.06.75
Studium:	1975-1978	Diplom-Biologie, an der Universität Bayreuth Vordiplom: 28.10.77
	1978-1981	Fortsetzung des Diplom-Biologie-Studiums an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen, Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Thema: Genomumstrukturierung bei Rhizobiaceae.
	15.12. 81	Diplom
Promotion:	1982-1984	Experimenteller Teil der Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen, Thema: Molekularbiologische Charakterisierung der Plasmidausstattung von A. tumefaciens Stämmen, die durch Genomumstrukturierung entstanden sind.

Nach der Geburt meiner Tochter Inka am 07.06.84 legte ich einen Mutterschaftsurlaub ein und fertigte danach den schriftlichen Teil meiner Dissertation an.